

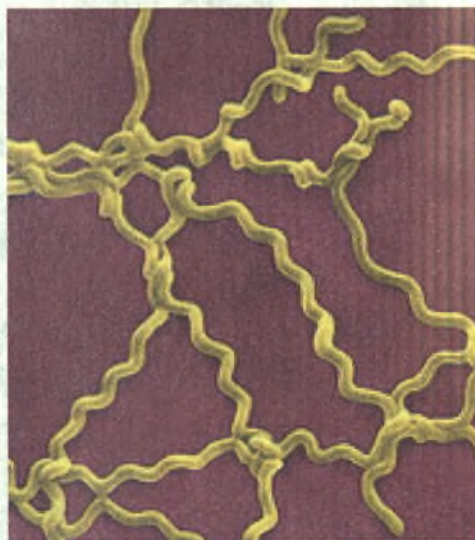


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

Νατσαρίδης Νικόλαος

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ
ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ



Λάρισα 2010



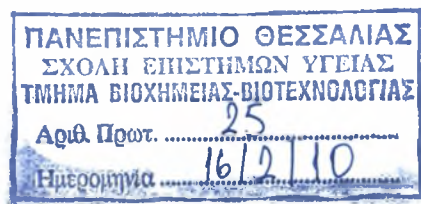
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 8141/1
Ημερ. Εισ.: 22-04-2010
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
579.3
NAT

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087090



Εφαρμογή μοριακής μεθόδου για τη διάγνωση λεπτοσπείρωσης και σύγκριση με κλασσικές μικροβιολογικές προσεγγίσεις

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ευθυμία Πετεινάκη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρ Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μόσιαλος Δημήτριος

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
-----------------------	---

ΜΕΡΟΣ Α: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ	10
<i>1.1 Λεπτόσπειρες</i>	10
<i>1.2 Ταξινόμηση</i>	11
<i>1.3 Κυτταρική δομή</i>	12
<i>1.4 Μεταβολισμός</i>	13
<i>1.5 Γονιδίωμα</i>	14
2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	15
3. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	18
4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	22
<i>4.1 Ανικτερική λεπτοσπείρωση</i>	22
<i>4.2 Ικτερική λεπτοσπείρωση</i>	23
5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ – ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	24
6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ	35
7. ΠΡΟΓΝΩΣΗ	36
8. ΘΕΡΑΠΕΙΑ	37

ΜΕΡΟΣ Β: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ	40
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	41
2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	42
<i>2.1.1 Υλικά</i>	42
<i>2.1.2 Ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων</i>	43
<i>2.1.3 Κριτήρια εγκυρότητας δοκιμασίας</i>	44
<i>2.1.4 Αξιολόγηση δοκιμασιών SERION ELISA classic λεπτόσπειρα IgG/ IgM</i>	45
2.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	46
<i>2.2.1 Πρωτόκολλο προετοιμασίας δειγμάτων και πειράματος PCR</i>	46
<i>2.2.2 Πρωτόκολλο προετοιμασίας δειγμάτων και πειράματος Real-Time PCR</i>	51
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	62
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λεπτοσπείρωση είναι μια ζωοανθρωπονόσος που προκαλείται από σπειροχαίτες του γένους *Leptospira*. Η βαρεία ικτερική μορφή της νόσου λέγεται νόσος του Weil. Επιδημιολογικά η λεπτοσπείρωση μπορεί να εμφανιστεί με σποραδικά κρούσματα ή με τη μορφή επιδημίας. Στις ΗΠΑ εμφανίζεται κυρίως σποραδικά. Υψηλή συχνότητα της νόσου παρατηρείται στη Νότιο Αμερική. Ιστορικά αναφέρουμε 40 επιδημίες λεπτοσπείρωσης κυρίως στην Κούβα. Όμως η νόσος υποδιαγιγνώσκεται και δεν καταγράφονται όλα τα κρούσματα. Γενικά, η λεπτοσπείρωση παρατηρείται συχνότερα σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, σε θερμά κλίματα, κατά τις περιόδους των βροχοπτώσεων και σε άτομα που έχουν ενασχόληση με ζώα. Όσον αφορά την εποχιακή κατανομή της νόσου, στην Ευρώπη είναι συχνότερη κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και τις αρχές του φθινοπώρου, ενώ στη Λατινική Αμερική κατά τη διάρκεια των βροχοπτώσεων [1]. Η λεπτοσπείρωση προσβάλλει συχνότερα τους άνδρες από τις γυναίκες, άτομα που διαμένουν σε αγροτικές παρά σε αστικές περιοχές και εμφανίζει τη μεγαλύτερη συχνότητα κατά την 4η δεκαετία της ζωής. Οι λεπτόσπειρες παρουσιάζουν μακροχρόνια συμβιωτική σχέση με τα ζώα. Τα ζώα του δάσους αποτελούν σημαντική πηγή επαναμόλυνσης ανθρώπων και κατοικιδίων. Οι πηγές μόλυνσης είναι κατά σειρά φθίνουσας συχνότητας τα σκυλιά, άλλα κατοικίδια ζώα, τα τρωκτικά, τα θηλαστικά του δάσους και οι γάτες. Αυξημένο κίνδυνο για τη νόσο έχουν οι εξής τρεις ομάδες πληθυσμού: α) ομάδες επαγγελματιών όπως σφαγείς, κτηνοτρόφοι, εργάτες υπονόμων, εργάτες σε φυτείες ρυζιού, στρατιώτες και κυνηγοί που τοποθετούν παγίδες, β) ομάδες αναψυχής που κάνουν μπάνιο σε φρέσκο νερό, ασχολούνται με kanoe kayak, κυνηγοί και ποδηλάτες στο βουνό και γ) ομάδες με ασχολίες στο οικιακό περιβάλλον, όπως το χάιδεμα των σκύλων, η κτηνοτροφία στο σπίτι, η κατασκευή συστημάτων αποθήκευσης βρόχινου νερού, καθώς και η παρουσία ποντικών. Η επίπτωση της νόσου κατά επαγγέλματα και κατά ομάδες πληθυσμού έχει ως εξής: συλλέκτες σκουπιδιών 46%, αγρότες 25%, κρεοπώλες 24%, εργαζόμενοι στο σπίτι 22% και παιδιά 15%. Η είσοδος του μικροοργανισμού στην κυκλοφορία γίνεται μέσω κάποιας λύσης της συνέχειας του δέρματος. Ακολουθεί η μετανάστευσή του σε όλα τα μέρη του σώματος. Προκαλεί έκλυση τοξινών και ενζύμων όπως η ενδοτοξίνη, που συνδέονται με χαρακτηριστικά κλινικά συμπτώματα και παθολογοανατομικά ευρήματα, όπως είναι η καταστροφή του ενδοθηλίου των αγγείων. Κατά συνέπεια, μέσω της αγγειίτιδας προκαλούνται αρχικά, βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων και τριχοειδών και ακολούβως βλάβη των νεφρικών σωληναρίων, των ηπατικών κυττάρων, μυοκαρδίτιδα και αιμορραγία

στους πνεύμονες. Η καταστροφή του ενδοθηλίου των τριχοειδών, προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας αυτών, επακόλουθη υποογκαιμία, η οποία οδηγεί σε επίταση της νεφρικής βλάβης και τελικά σε εγκατάσταση shock [2].

Η λεπτοσπείρωση μπορεί να εμφανιστεί με δύο μορφές: την ανικτερική με ήπια κλινική εικόνα και την ικτερική ή ικτεροαιμορραγική, η οποία καλείται και νόσος του Weil και έχει έντονη κλινική εικόνα. Η ανικτερική μορφή της νόσου παρουσιάζει δύο στάδια: το σηψαιμικό στάδιο που χαρακτηρίζεται από πυρετό, κεφαλαλγία, μυαλγίες, ναυτία και έμετους και το άνοσο στάδιο που χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο πυρετό, κεφαλαλγία, έμετους και άσηπτη μηνιγγίτιδα. Η νόσος του Weil επίσης παρουσιάζει δύο φάσεις, τη σηπτική και την άνοση. Κατά την εξέλιξη της νόσου παρατηρούμε κατά τη συνήθη σειρά εμφάνισης, τα εξής: πυρετό, κεφαλαλγία, μυαλγίες, νεφρική και ηπατική προσβολή, υπόταση, αιμορραγίες και αιμορραγική πνευμονίτιδα. Καθώς οι δύο μορφές της λεπτοσπείρωσης μπορεί να επικαλύπτονται, αναφέρουμε γενικά όλα τα σημεία και συμπτώματα της νόσου: πυρετός, ίκτερος, ευαισθησία στις γαστροκνημίες, έμετοι, κεφαλαλγία, ηπατομεγαλία, ολιγουρία, διάρροια, αιμορραγία, διαταραχές του επιπέδου συνείδησης, αιματέμεση και μέλαινα. Μελετώντας τα όργανα - στόχους παρατηρούμε: α) από τους νεφρούς: οξεία διάμεση νεφρίτιδα, οξεία νεφρική ανεπάρκεια με πολουρία και υποκαλιαμία λόγω απέκκρισης του καλίου από το άπω εσπειραμμένο σωληνάριο, β) από τους οφθαλμούς: υπεραιμία των επιπεφυκότων, ερυθρότητα του αμφιβληστροειδούς, αύξηση της διαμέτρου των φλεβών του χορειοειδούς, εξιδρώματα, αιμορραγίες κι εξέρυθρη θηλή, γ) από το δέρμα: εξάνθημα κηλιδώδες, κηλιδοβλατιδώδες, ερυθρηματώδες, κνιδωτικό, ή πετεχειώδες με κατανομή κυρίως στον κορμό, δ) από το ΚΝΣ: κεφαλαλγία, μηνιγγίτιδα στο δεύτερο στάδιο της νόσου (κύτταρα στο ENY<500), νευρίτιδα και πολυνευρίτιδα, ε) από την καρδιά: μυοκαρδίτιδα, επιδείνωση της καρδιακής λειτουργίας λόγω των μεταβολικών διαταραχών και αρρυθμίες και στ) από τους πνεύμονες: δυσπνοια, κυάνωση, υγρούς ρόγχους στις βασεις και αιμόπτυση.

Τα εργαστηριακά ευρήματα στη λεπτοσπείρωση είναι η αύξηση στον ορό των ασθενών της χολερυθρίνης, η ήπια αύξηση των τρανσαμινασών, η πτώση του αιματοκρίτη, η λευκοκυττάρωση με πολυμορφοπυρήνωση, η θρομβοπενία, η αύξηση της κρεατινικής κινάσης και η αύξηση των ουρίας και κρεατινίνης. Οι διαταραχές της πήξης οδηγούν σε παράταση του χρόνου ροής προθρομβίνης και μερικής θρομβοπλαστίνης, μείωση του παράγοντα V, μείωση του χρόνου θρομβίνης και αύξηση του ινωδογόνου και των προϊόντων αποδομής αυτού. Κατά τη γενική εξέταση

των ούρων παρατηρούμε αιματουρία, πυουρία, αιμοσφαιρινουρία, πρωτεϊνουρία, μυοσφαιρινουρία και παρουσία κοκκωδών και υαλωδών κυλίνδρων. Στην απλή ακτινογραφία θώρακα την 3η με 9η μέρα μετά την έναρξη της νόσου είναι δυνατόν να παρατηρηθούν τα εξής: πολλαπλά μικρά διηθήματα, που είναι και το συχνότερο ακτινολογικό εύρημα, γενικευμένη διάμεση πνευμονίτιδα, εικόνα κεγχροειδούς, ατελεκτασία, πνευμονία, πλευριτική συλλογή και σπάνια οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια.

Τα παθολογοανατομικά ευρήματα της νόσου είναι από τους νεφρούς: η ισχαιμική βλάβη αυτών, η νέκρωση των επιθηλιακών κυττάρων του άπω εσπειραμμένου σωληναρίου και της αγκύλης του Henle, η διάμεση νεφρίτιδα και σπανιότερα η βλάβη των σπειραμάτων και από το ήπαρ: η χωρίς νέκρωση χολόσταση, η αποδιοργάνωση των ηπατοκυττάρων, οι μιτωτικές εικόνες και οι εκσεσημασμένες διαταραχές των παρεγχυματικών κυττάρων [3].

Η διάγνωση της λεπτοσπείρωσης δεν είναι πάντα εύκολη και προϋποθέτει υψηλό δείκτη υποψίας από το γιατρό, ειδικά σε ενδημικές περιοχές. Η λεπτοσπείρωση πρέπει να θεωρείται πιθανή διάγνωση σε κάθε ασθενή με πυρετό κι ευαισθησία στις γαστροκνημίες, με ή χωρίς ίκτερο, με ή χωρίς ολιγουρία και επηρεασμένη νεφρική λειτουργία. Η εργαστηριακή επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης γίνεται κατά κύριο λόγο με την καλλιέργεια της λεπτόσπειρας σε ειδικά καλλιεργητικά υλικά ή με την αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων κατά της λεπτόσπειρας κατά το τετραπλάσιο στον ορό του ασθενούς .

Τα φάρμακα που χορηγούνται στη λεπτοσπείρωση είναι η πενικιλίνη 1,5 εκατομμύρια IU ανά 6ωρο, ή η τετρακυκλίνη, κυρίως η δοξυκυκλίνη 100mg ανά 12ωρο.

Οι προγνωστικοί παράγοντες που καθορίζουν την εξέλιξη της νόσου είναι η οξεία νεφρική ανεπάρκεια, η οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, η οξεία μυοκαρδίτιδα, οι αιμορραγικές εκδηλώσεις και το shock. Όσο περισσότεροι από τους ανωτέρω προγνωστικούς παράγοντες είναι παρόντες, τόσο πιο δυσμενής είναι η πρόγνωση. Η προφύλαξη από τη νόσο εξατομικεύεται. Σε άτομα που ταξιδεύουν σε ενδημικές περιοχές συνιστάται η χορήγηση 200mg δοξυκυκλίνης την εβδομάδα για τον χρόνο διαμονής.

Η πρόληψη της νόσου είναι δύσκολη. Γενικά μέτρα αποτελούν η αποφυγή μπάνιου σε λίμνες και ποτάμια και η απολύμανση των μολυσμένων περιοχών [4].

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ

1.1 ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΕΣ

Περιγράφηκε για πρώτη φορά από την Adolf Weil το 1886 ως "οξεία λοιμώδη νόσο με τη διόγκωση του σπλήνα, ίκτερο και νεφρίτιδα". Η *Leptospira* απομονώθηκε για πρώτη φορά ήταν το 1907 σε ιστό νεφρού.

Η λεπτόσπειρα οφείλει το όνομα της στο σχήμα της (λεπτή και σπείρα).

Η λεπτόσπειρα (εικόνα 1) είναι Gram (-) βακτήριο που ανήκει στο γένος των σπειροχαιτών, στην τάξη Spirochaetales και στην οικογένεια *Leptospiraceae*. Παραδοσιακά, το γένος *Leptospira* απαρτίζεται από δύο είδη: το παθογόνο *L. interrogans* και το σαπρόφυτο *L. biflexa*. Μολονότι σήμερα αναγνωρίζονται εννέα είδη παθογόνων λεπτοσπειρών με βάση τις ομοιότητες του DNA, κλινικά και επιδημιολογικά είναι πιο πρακτικό να χρησιμοποιείται η ταξινόμηση που βασίζεται σε ορολογικές διαφορές. Οι παθογόνες λεπτόσπειρες διαιρούνται σε ορότυπους (serovars) ανάλογα με την αντιγονική τους σύσταση. Πάνω από 200 ορότυποι απαρτίζουν 23 ορομάδες.

Η *L. interrogans* παρασιτεί τους ιστούς διάφορων αγρίων ζώων που ζούν ελεύθερα, καθώς και ζώων με τα οποία έρχεται σε επαφή ο άνθρωπος όπως τα τρωκτικά, οι αγελάδες, τα πρόβατα και οι σκύλοι.

Η *L. biflexa* ζει στα νερά λιμνών, ποταμών, υγρών συλλόγων και δεν είναι παθογόνος για τον άνθρωπο και τα ζώα.

Η λεπτόσπειρα έχει σπειροειδές σχήμα, με μήκος 6-20μm και περίμετρο 0,1μm. Τα άκρα της λεπτόσπειρας κάμπτονται προς τα μέσα, από τη μια ή και τις δύο πλευρές, σαν αγγλικό ερωτηματικό (hooked, τα οποία βοηθούν τον μικροοργανισμό να διεισδύει στους ιστούς.)

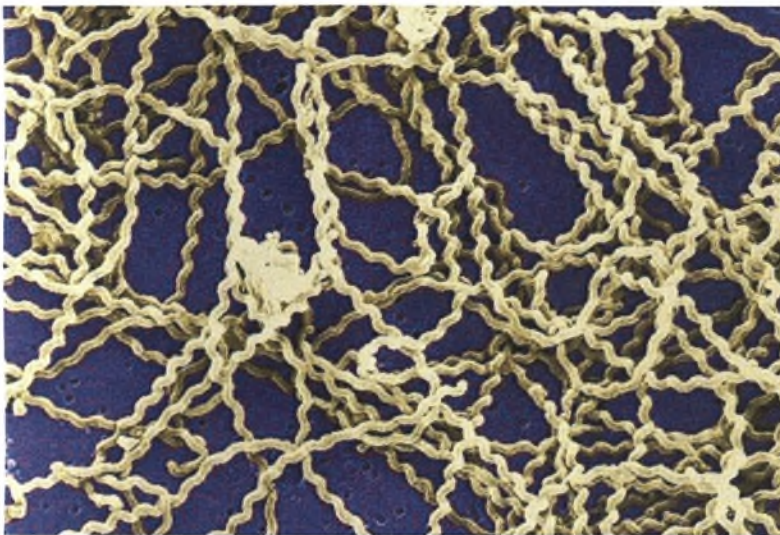
Η λεπτόσπειρα οφείλει το όνομα της στο σχήμα της. Κινείται με ελικοειδή κίνηση χωρίς κάμψη του σωματός της και παρατηρείται σε μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου μετά από αργυρούχο χρώση [5].

Η λεπτόσπειρα πολλαπλασιάζεται με μονογονική διχοτόμηση, δεν παρουσιάζει δηλαδή εναλλαγή διπλοειδούς και απλοειδούς φάσης και κατα συνέπεια μεταβιβάζει DNA από το ένα κύτταρο στο άλλο. Η μεταβίβαση αυτή, δεν είναι βασικό στοιχείο

της αναπαραγωγής της λεπτόσπειρας και επιπλέον δε μεταβιβάζεται όλο το DNA, αλλά ένα τμήμα του. Όταν όμως βρίσκονται κάτω από διατροφική πίεση αποτυγχάνει ο διαχωρισμός τους.

Η λεπτόσπειρα μπορεί να επιβιώσει σε διαφορετικό φυσικό περιβάλλον (άλλωστε έχει ανακαλυφθεί σε όλα τα σημεία του πλανήτη, εκτός από την Ανταρκτική). Προτιμά όμως, υγρασία και ουδέτερο pH (6,9-7,4) όπως για παράδειγμα στάσιμα νερά, ρηχές λίμνες, δεξαμενές, λακκούβες κτλ καθώς αυτά είναι το φυσικό περιβάλλον της.

Από το βακτήριο της λεπτόσπειρας προκαλείται η νόσος λεπτοσπειρωση [6].



Εικόνα 1: Απεικόνιση της λεπτόσπειρας σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Χαρακτηριστική η σπειροειδής μορφή της.

1.1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η λεπτόσπειρα ανήκει στην οικογένεια *Leptospiraceae* και χωρίζεται σε 20 είδη με βάση DNA [7].

Παθογόνα βακτήρια

Leptospira interrogans
Leptospira kirschneri
Leptospira noguchii
Leptospira alexanderi
Leptospira weilii

Leptospira genomospecies 1
Leptospira borgpetersenii
Leptospira santarosai
Leptospira kmetyi

Δυνητικά παθογόνα ή ευκαιριακά

Leptospira inadai
Leptospira fainei
Leptospira broomii
Leptospira licerasiae
Leptospira wolffii

Μη παθογόνα

Leptospira biflexa
Leptospira meyeri
Leptospira wolbachii
Leptospira genomospecies 3
Leptospira genomospecies 4
Leptospira genomospecies 5

1.1.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΟΜΗ

Η δομή της λεπτόσπειρας χαρακτηρίζεται από στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης η οποία επικοινωνεί περισσότερο με το κυτταρόπλασμα παρά με την εξωτερική μεμβράνη.

Η κίνηση της λεπτόσπειρας αποδίδεται στην παρουσία δύο ενδοβλεφαρίδων ή περιπλασματικών βλεφαρίδων που εκτείνονται μεταξύ της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του περιπλασματικού χώρου.

Η εξωτερική μεμβράνη αποτελείται από ποικιλία λιποπρωτεϊνών και από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Η σύνθεση των πρωτεϊνών της μεμβράνης της λεπτόσπειρας που αναπτύσσεται σε τεχνητό περιβάλλον, έχει παρατηρηθεί ότι διαφέρει από τη σύνθεση της μεμβράνης της λεπτοσπειρας που παρασιτεί σε κάποιο ζώο. Σε κάποια είδη λεπτόσπειρας φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης επιτίθενται στον οργανισμό του ξενιστή. Οι πρωτεΐνες αυτές προφανώς παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσβολή των ιστών του ξενιστή αλλά και στην αντίσταση του βακτηρίου στην άμυνα του οργανισμού στον οποίο παρασιτεί.

Η μεμβράνη της λεπτόσπειρας, όπως και των περισσότερων Gram αρνητικών βακτηρίων, περιλαμβάνει λιποπολυζακχαρίτες (LPS), οι οποίοι είναι υπεύθυνοι και για την ανοσία του βακτηρίου [8].

1.1.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Οι λεπτόσπειρες είναι οργανισμοί **χημειοετερότροφοι** και χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων. Τα λιπαρά οξέα είναι η μόνη σημαντική πηγή ενέργειας που παράγεται μέσω της οξείδωσης. Τα σάκχαρα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή για τον άνθρακα, αν και οι υδατάνθρακες μπορούν να συντεθούν μέσω του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων [9].

1.1.5 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Οι λεπτόσπειρες είναι φυλογενετικώς συγγενείς με τις άλλες σπειροχαίτες. Το γονιδίωμα της λεπτόσπειρας έχει μέγεθος 5,000 kb, ενώ έχουν αναφερθεί εκτιμήσεις για μικρότερο μέγεθος. Το γονιδίωμα αποτελείται από δύο τμήματα, ένα χρωμόσωμα 4,400 kb και ένα μικρότερο χρωμόσωμα 350 kb (εικόνα 2). Άλλα πλασμίδια δεν έχουν αναφερθεί. Φυσικοί χάρτες έχουν δημιουργηθεί από ορότυπους *Pomona* υπότυπου *kennewicki* και *icterohaemorrhagiae*. Οι λεπτόσπειρες περιέχουν δύο σετ από 16S και 23S rRNA γονίδια, αλλά μόνο ένα 5S rRNA γονίδιο, και τα rRNA γονίδια είναι ευρέως.

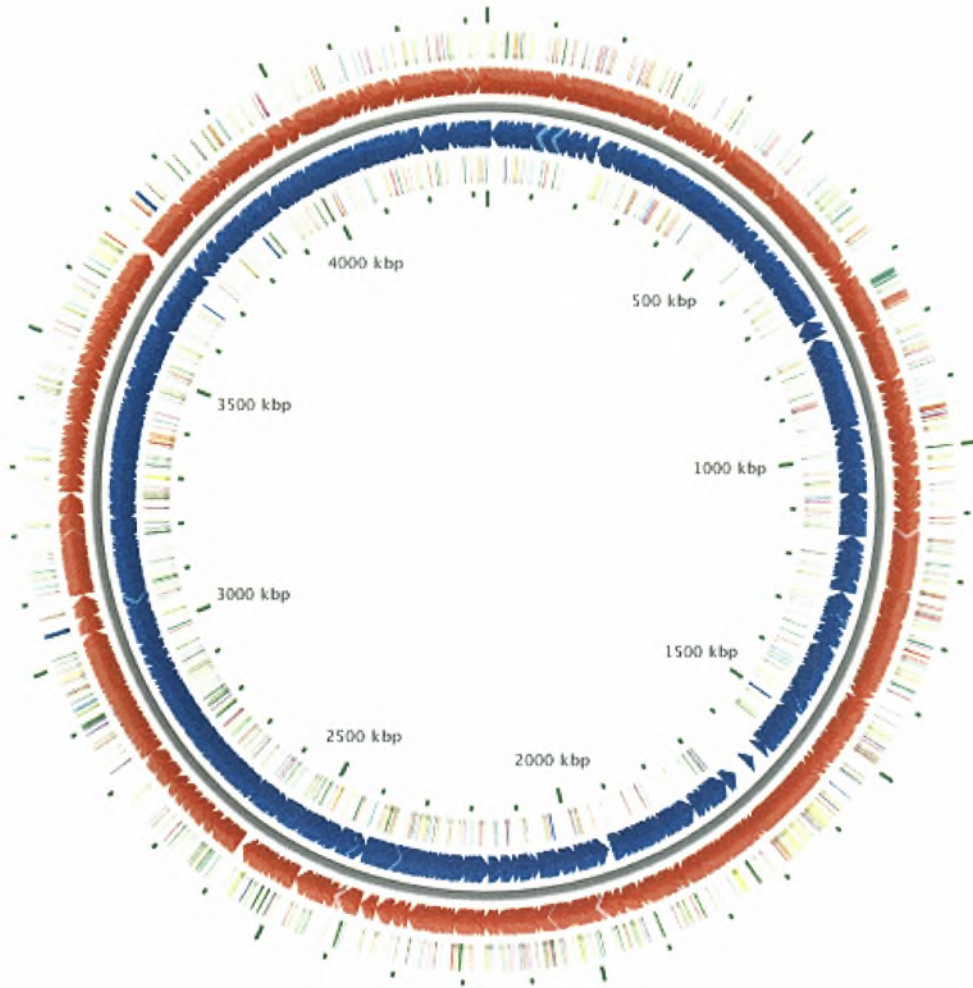
Η μελέτη του γονιδιώματος της λεπτόσπειρας έχει καθυστερήσει εξαιτίας της απουσίας συστήματος μεταμόρφωσης. Πρόσφατα, ένας μετακινούμενος φορέας έχει αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας τον ήπιο βακτηριοφάγο LE1 από τη *L. biflexa*. Ο φορέας αυτός προσφέρει την προοπτική για ταχεία πρόοδο στην κατανόηση της *Leptospira* σε μοριακό επίπεδο.

Έχουν διαπιστωθεί διάφορα ταυτοποιητικά στοιχεία, από τα οποία αρκετά είναι εσωτερικές αλληλουχίες (IS) που κωδικοποιούν τρανσποζάσες. Η IS1533 έχει ένα μόνο ανοιχτό ανάγνωστο πλαίσιο, ενώ η IS1500 έχει τέσσερα. Τόσο η IS1500 όσο και η IS1533 έχουν βρεθεί σε πολλούς οροτύπους, αλλά ο αριθμός αντιγράφου ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων οροτύπων και απομονώσεων του ίδιου οροτύπου. Ο ρόλος αυτών των εσωτερικών αλληλουχιών στην αντιμετάθεση και την αναδιάταξη

του γενετικού υλικού έχει αναγνωρισθεί. Έχουν αναφερθεί επίσης και άλλες ενδείξεις για οριζόντια μεταφορά μέσα στο γένος *Leptospira*.

Ένας αριθμός γονιδίων λεπτόσπειρας έχουν κλωνοποιηθεί και αναλυθεί, συμπεριλαμβανομένων αρκετών για τη σύνθεση αμινοξέων, rRNA, ριβοσωμικών πρωτεϊνών, RNA πολυμεράσης, διόρθωσης DNA, πρωτεϊνών θερμικού σοκ, σφιγγομυελινάσης, αιμολυσινών, πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης, πρωτεϊνών μαστιγίου και τη σύνθεση λιποπολυσακχαριδίου (LPS).

Συγκεκριμένα, για τον ορότυπο *icterohaemorrhagie*, το γονιδίωμα διατηρείται κάτι που επέτρεψε την ταυτοποίηση ενός τουλάχιστον νέου ορότυπου με την αναγνώριση σαφών προφίλ κατά την ηλεκτροφόρηση γέλης παλλόμενου πεδίου (PFGE). Ωστόσο, η πρόσφατη επιβεβαίωση της γενετικής ετερογένειας στους ορότυπους καθιστά αναγκαία την περαιτέρω μελέτη πολλαπλών απομονώσεων από διαφορετικούς ορότυπους [10,11].



Accession: NC_004342

Length: 4,332,241 bp; Genes: 4,441

Εικόνα 2: Χρωμοσωμικός χάρτης της *Leptospira interrogans*.

2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η λεπτοσπείρωση (νόσος που προκαλείται από τις λεπτόσπειρες) είναι μια ζωνόσος η οποία προσβάλλει πολλά θηλαστικά στον κόσμο. Η λοίμωξη αυτή επικρατεί στις τροπικές περιοχές και στις εύκρατες ζώνες κατά τη διάρκεια των ζεστών περιόδων [12]. Στα ζώα η προκαλούμενη νόσος ποικίλει από ασυμπτωματική λοίμωξη μέχρι ταχύτατα θανατηφόρα. Τα περισσότερα όμως από τα προσβαλλόμενα ζώα καθίστανται χρόνιοι φορείς και διασπείρουν τις λεπτόσπειρες, κυρίως με τα ούρα, στο περιβάλλον για μήνες ή και για έτη. Η επιβίωση της λεπτόσπειρας

εξαρτάται κυρίως από το pH των ούρων του ζώου αλλά και από το pH του νερού ή του εδάφους στα οποία καταλήγουν καθώς και από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αν το pH είναι ουδέτερο ή αλκαλικό (6,9-7,4) και διασπαρθούν σε υγρό περιβάλλον, που δεν έχει σημαντικό αριθμό μικροοργανισμών, δεν έχει ρυπανθεί με απορρυπαντικά, έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε άλατα και θερμοκρασία >29°C, επιζούν για αρκετές εβδομάδες. Αντίθετα, η ηλιακή ακτινοβολία, η ξηρασία, η μεγάλη περιεκτικότητα των νερών σε νάτριο (θαλασσινό νερό) και διάφορες άλλες χημικές προσμίξεις φονεύουν τη λεπτόσπειρα.

Οι λεπτόσπειρες απαντώνται στα διάφορα είδη ποντικών (αρουραίοι, μυς, επίμυς, κτλ) όπου συνήθως είναι οι αρχέγονοι ξενιστές και αποτελούν αποθήκη των μικροοργανισμών. Από λεπτοσπείρωση πάσχουν πολλά άγρια αλλά και κατοικίδια ζώα, όπως σκυλιά, γάτες, πίθηκοι, βοοειδή, γουρούνια, αλεπούδες, διάφορα πτηνά καθώς και θαλάσσια θηλαστικά.

Μερικοί ορότυποι συνδέονται με συγκεκριμένες ζώα π.χ. *interohaemorrhagiae* /*copenhageni* με αρουραίους, *grippotyphosa* με τυφλοπόντικες, *hardjo* με βοοειδή, *canicola* με σκύλους και *romona* με χοίρους.

Οι άνθρωποι μολύνονται άμεσα μετά από επαφή με μολυσμένα ζώα (με αίμα, ούρα, γάλα ή με τους ιστούς) και έμμεσα από επαφή με μολυσμένο περιβάλλον (στάσιμα, ακάθαρτα νερά). Άμεση μετάδοση της ασθένειας από τον πάσχοντα σε υγιή άνθρωπο δεν έχει αναφερθεί [13].

Όλα τα είδη της *Leptospira interrogans* (οι ορότυποι και τα στελέχη της) θεωρούνται σήμερα παθογόνα για τον άνθρωπο.

Πύλη εισόδου του βακτηρίου για τον άνθρωπο αποτελούν οι λύσεις συνεχείας του δέρματος και των βλεννογόνων, οι επιπεφυκότες, το στόμα, η αναπνευστική οδός κτλ. Αρχικά πολλαπλασιάζονται στους επιχώριους λεμφαδένες και στη συνέχεια διασπείρονται αιματογενώς στον υπαραχνοειδή χώρο, στο ήπαρ, στους νεφρούς αλλά και σε άλλα όργανα όπου και παραμένουν για εβδομάδες. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να εισέλθουν και διαμέσου του υγιούς δέρματος όταν αυτό διαβρέχεται για μεγάλο χρονικό διάστημα με μολυσμένο νερό.

Πριν το 1970 τα περισσότερα περιστατικά λεπτοσπείρωσης είχαν παρατηρηθεί κυρίως σε ορισμένες επαγγελματικές ομάδες. Στις ΗΠΑ, την περίοδο 1970-1979 παρουσιάζονταν 50 έως 150 περιπτώσεις κάθε χρόνο και αυξήθηκαν τα κρούσματα μεταξύ παιδιών. Σήμερα μόνο το 50% των περιπτώσεων της ασθένειας έχουν σχέση

με το επάγγελμα. Η λεπτοσπείρωση παρατηρείται συνήθως το καλοκαίρι και το 80% αφορά άνδρες.

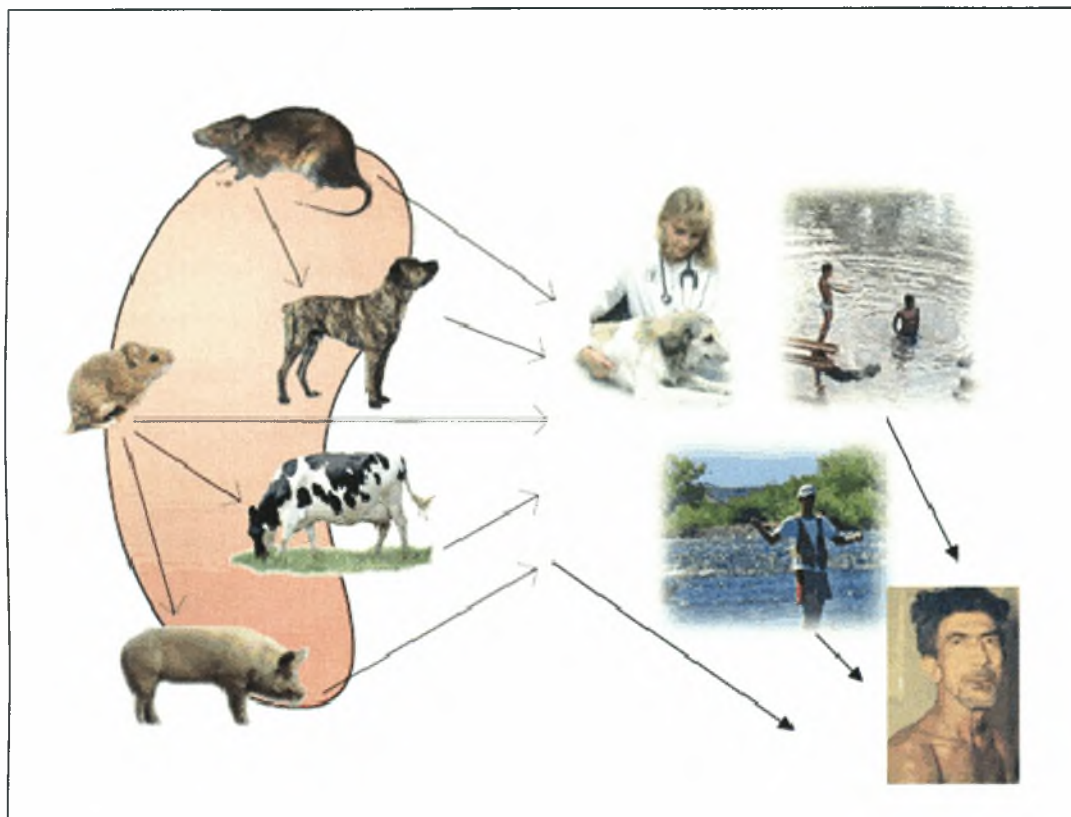
Το Σεπτέμβριο του 1996 αναφέρθηκε μικροεπιδημία στην κωμόπολη Κανάλια στην Κέρκυρα η οποία είχε δύο θανατηφόρα κρούσματα και προήλθε από μόλυνση των νερών από ποντίκια, τα οποία αποτελούν και αποθήκη των μικροοργανισμών. Η μικρή αυτή πόλη στερούνταν δικτύου αποχέτευσης λυμάτων, άρα υπήρχε μόνιμη εστία μόλυνσης από την μεγάλη παρουσία ποντικών. Επίσης περιπτώσεις λεπτοσπείρωσης αναφέρθηκαν το 1997 στην Κρήτη [14].

Κάθε χρόνο στα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης των Νόσων (CDC) στις ΗΠΑ αναφέρονται 40-120 περιστατικά, ωστόσο η πραγματική επίπτωση της λεπτόσπειρας στις ΗΠΑ δεν είναι γνωστή. Η υψηλότερη επίπτωση αναφέρεται σε περιοχές του Νότιου Ατλαντικού, στον Κόλπο και σε παραλίες του Ειρηνικού. Το 1993, οι 24 από τις 51 περιπτώσεις που αναφερθήκαν παρατηρήθηκαν στη Χαβάη. Η μέση ετήσια επίπτωση στις ΗΠΑ είναι 0,05/100.000 κατοίκους, ενώ στη Χαβάη είναι 1,03/100.000 κατοίκους [15].

Επαγγελματίες οι οποίοι διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο να εκτεθούν στη λεπτόσπειρα είναι γεωργοί, κτηνοτρόφοι, σφαγείς, κυνηγοί, κτηνίατροι, ξυλοκόποι, κηπουροί, εργάτες υπόνομων, προσωπικό κρεοπωλείων και γαλακτοπωλείων, καθαριστές ψαριών ή πτηνών, ανθρακωρύχοι, στρατιωτικό προσωπικό, κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες αφού η λεπτόσπειρα δεν αντέχει το κρύο. Αλλά ευτυχώς η βελτίωση των συνθηκών υγιεινής στην εργασία και τα μέτρα προφύλαξης έχουν ελαττώσει σημαντικά τη συχνότητα των επαγγελματικών ασθενειών.

Ψυχαγωγικές δραστηριότητες που σχετίζονται με τη μετάδοση της νόσου είναι η κολύμβηση, το κανό, η ποδηλασία, ιστιοσανίδα, κολύμβηση και σκι, γενικά η ψυχαγωγία στο νερό ή η διέλευση μοτοσικλέτας από μολυσμένα νερά (εικόνα 3).

Μερικές φορές η μόλυνση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια ταξιδιού στο εξωτερικό. Σε μια πρόσφατη μελέτη στην Ολλανδία, το 14% των ασθενών με επιβεβαιωμένη λεπτοσπείρωση εμφάνισαν τη λοίμωξη, μετά απο ταξίδι σε τροπικές χώρες, κυρίως της Νοτιοανατολικής Ασίας. Έχει αναφερθεί και μετάδοση κατόπιν ατυχήματος στο εργαστήριο, αλλά αυτό είναι σπάνιο. Μερικές φορές, η λεπτοσπείρωση αναπτύσσεται μετά από απρόβλεπτη εμβάπτυση σε μολυσμένο νερό π.χ. σε τροχαίο ατύχημα [14].



Εικόνα 3: Τρόπος μετάδοσης της λεπτόσπειρας, είτε άμεσα μετά από επαφή με μολυσμένα ζώα (με αίμα, ούρα, γάλα ή με τους ιστούς), είτε έμμεσα μετά από επαφή με μολυσμένο περιβάλλον (στάσιμα, ακάθαρτα νερά).

Έχουν αναφερθεί περιστατικά μετάδοσης της νόσου και από μολυσμένα αντικείμενα όπως κουτάκια αναψυκτικών.

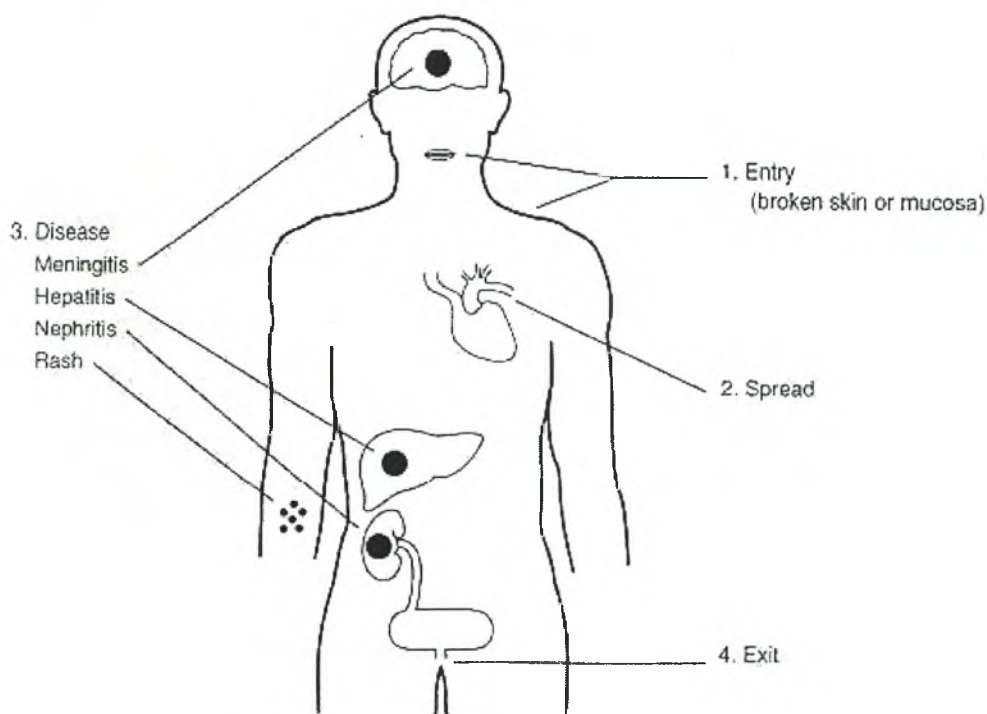
Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο λιμάνι του Πειραιά για την ανίχνευση λεπτόσπειρας, αρουραίοι συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο ζωντανοί. Κανένας από τους 25 αρουραίους που συλλήφθηκαν δεν βρέθηκε μολυσμένος με *leptospira*. Φαίνεται ότι οι αρουραίοι λιμένων που ζουν στην πυκνά κατοικημένη περιοχή της πόλης του Πειραιά θα μπορούσαν να γίνουν μια πηγή μόλυνσης για το άτομο και τα ζώα με μικροοργανισμούς ιδιαίτερα ανθεκτικούς [16].

3. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Ως κύριοι λοιμογόνιοι παράγοντες των λεπτοσπειρών αναφέρονται η κινητικότητα τους και η παραγωγή υαλουρονιδάσης (ένζυμο που καταστρέφει το υαλουρινικό οξύ και οδηγεί σε λύση του συνδετικού ιστού).

Οι λεπτόσπειρες εισέρχονται γρήγορα στην κυκλοφορία του αίματος αφού διεισδύσουν από το δέρμα ή από τους άθικτους βλεννογόνους ειδικά του

επιπεφικότα, του στοματοφάρυγγα ή του ρινοφάρυγγα. Οι μικροοργανισμοί εξαπλώνονται, λόγω της λεπτοσπειραιμίας που αναπτύσσεται, σε όλο τον οργανισμό συμπεριλαμβανομένου του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και του υαλοειδούς σώματος του οφθαλμού. Ο πολλαπλασιασμός τους λαμβάνει χώρα στο αίμα και στους ιστούς (εικόνα 4). Η κινητικότητα τους βοηθά στη γρήγορη διείσδυση τους στους ιστούς. Τοξίνες και ένζυμα που παράγονται από τις λεπτόσπειρες θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην παθογένεια της νόσου, αλλά τέτοιες ουσίες δεν έχουν απομονωθεί. Ωστόσο, τα κλινικά χαρακτηριστικά της λοίμωξης υποδηλώνουν την παρουσία ενδοτοξίνης. Πρόσφατα πολλά εργαστήρια έχουν απομονώσει ουσία παρόμοια με λιποπολυσακχαρίτη, η οποία όμως δεν έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην παθογένεια της νόσου [17].



Εικόνα 4: Πύλες εισόδου της λεπτόσπειρας στον ανθρώπινο οργανισμό και όργανα στόχοι.

Συνήθως οι λεπτόσπειρες διαδράμουν δύο φάσεις, οι οποίες αλληλεπικαλύπτονται. Μετά από την περίοδο επώασης, η οποία κυμαίνεται από 2 έως 20 μέρες, αρχίζει η πρώτη φάση. Αυτή διαρκεί μια περίπου εβδομάδα και χαρακτηρίζεται από μικροβιαίμια και από συμπτώματα και σημεία μιας βαριάς συστηματικής λοίμωξης, με υψηλό πυρετό, γενική κακουχία, μυϊκός πόνος, πόνος στα μάτια, επιπεφυκίτιδα και αιμορραγία στο σκληρό χιτώνα του ματιού. Αυτά θεωρείται ότι οφείλονται στην απελευθέρωση ενδοτοξινών από τις λεπτόσπειρες που

πεθαίνουν. Η δεύτερη φάση χαρακτηρίζεται από την αυξημένη συγκέντρωση αντισωμάτων στον ορό, όπως είναι οι λυσίνες, οι συγκολιτίνες και οι ανοσίνες, από την εξαφάνιση των λεπτοσπειρών από το αίμα, από την αποβολή τους με τα ούρα και από την εμφάνιση συμπτωμάτων και σημείων από τα διάφορα όργανα και συστήματα οι συγκολιτίνες χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της νόσου.

Πιο αναλυτικά, η αιμορραγική διάθεση η οποία παρατηρείται σε βαριές περιπτώσεις λεπτοσπείρωσης θεωρείται ότι δεν οφείλεται σε κατανάλωση προθρομβίνης ή σε θρομβοπενία αλλά οφείλεται σε σοβαρή αγγειίτιδα με βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία καταλήγει σε τραυματισμό των τριχοειδών. Ο ίκτερος οφείλεται σε ηπατική δυσλειτουργία, η οποία εργαστηριακά εκδηλώνεται επίσης με μείωση των επιπέδων της αλβουμίνης, αύξηση των σφαιρινών και διαταραχή της παραγωγής των παραγόντων πήξης που εξαρτώνται από τη βιταμίνη Κ. Παθολογοανατομικές μελέτες του ήπατος έδειξαν μόνο ελαφρά ή εστιακή ηπατοκυτταρική νέκρωση. Τα αποτελέσματα των ιστοχημικών μελετών υποδηλώνουν ότι η βασική ηπατική βλάβη οφείλεται σε τοξική δράση τα ενζυμικά συστήματα του ηπατοκυττάρου.

Οι βλάβες στο ήπαρ δεν είναι ειδικές και ελάχιστα σχετίζονται με την ένταση των λειτουργικών ανωμαλιών που διαπιστώνονται στον βιοχημικό έλεγχο. Οι νεκρώσεις των ηπατικών κυττάρων είναι περιορισμένες σε αραιές εστίες. Παρατηρείται περιπυλαία διήθηση με λεμφοκύτταρα, όπως επίσης και στάση χολής στα ενδοηπατικά χοληφόρα, ειδικά επί ικτερικών ασθενών. Σταθερό εύρημα είναι η διόγκωση των κυττάρων Kupffer.

Η νεφρική ανεπάρκεια οφείλεται σε σωληναριακή βλάβη, συχνά χωρίς διάμεση φλεγμονή. Τα παθολογοανατομικά ευρήματα από το νεφρό περιλαμβάνουν νέκρωση των επιθηλιακών κυττάρων των σωληναρίων (κυρίως των άπω εσπειραμένων και του ανιόντος σκέλους της αγκύλης του Henle), εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά διηθήματα. Υπάρχουν σημαντικά στοιχεία που πιστοποιούν ότι η υποξία, η οποία οφείλεται στη νεφρική ισχαιμία, είναι ο βασικός μηχανισμός της νεφρικής προσβολής στη λεπτοσπείρωση. Σε βαριές περιπτώσεις, μπορεί να παρατηρηθούν υποογκαιμία και υπόταση ως αποτέλεσμα αφυδάτωσης, μαζικής αιμορραγίας ή διαταραχής της διαπερατότητας των τριχοειδών εξαιτίας της αγγειίτιδας. Η δυσλειτουργία του μυοκαρδίου μπορεί να οδηγήσει σε ελάττωση της καρδιακής παροχής και της περιφερικής αιμάτωσης. Μυοκαρδίτιδα, μυοπερικαρδίτιδα και καρδιακές αρρυθμίες αποτελούν επίσης συχνές εκδηλώσεις.

Οι πνευμονικές βλάβες είναι κυρίως αιμορραγικές και όχι φλεγμονώδης. Οι φλεγμονώδεις αλλοιώσεις που παρατηρούνται στους πνεύμονες πιθανά οφείλονται σε δευτεροπαθή πυογόνο λοίμωξη. Τα συχνότερα παθολογοανατομικά ευρήματα από τους πνεύμονες είναι πετέχιες, αιμορραγίες και κατά τόπους αιμορραγική πνευμονίτιδα.

Η προσβολή του ΚΝΣ είναι συχνή σε ασθένειες με λεπτοσπείρωση, αν και η παθογένεια της φλεγμονής των μηνίγγων είναι άγνωστη. Οι λεπτόσπειρες εισέρχονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) στην πρώιμη σηψαιμική φάση της νόσου. Ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία φλεγμονώδους αντίδρασης στο ΕΝΥ. Τα σημεία του μηνιγγισμού εμφανίζονται κατά τη δεύτερη εβδομάδα της νόσου μετά την εκκαθάριση των λεπτόσπειρων από το ΕΝΥ. Η μηνιγγική αντίδραση πιθανά οφείλεται σε κυκλοφορία ανοσοσυμπλεγμάτων.

Οι λεπτόσπειρες εισέρχονται στο υαλοειδές σώμα του οφθαλμού κατά τη διάρκεια της σηψαιμικής φάσης και μπορεί να παραμείνουν εκεί για αρκετούς μήνες. Μπορεί να εμφανιστεί ραγοειδίτιδα κατά τη διάρκεια της δεύτερης εβδομάδας της νόσου. Η παραμονή μικροβίων στο υαλοειδές υγρό μπορεί να προκαλέσει χρόνια λανθάνουσα υποτροπιάζουσα ραγοειδίτιδα.

Οι μυαλγίες είναι συχνό εύρημα στη λεπτοσπείρωση. Η εισβολή των λεπτοσπειρών στους σκελετικούς μυς δημιουργεί εξοίδηση και εστιακή νέκρωση. Η βιοψία μυός αναδεικνύει κυτταροπλασματικά κενοτόπια στα μυικά ινίδια παράλληλα με πολυμορφοπυρηνική διήθηση. Τα ευρήματα της βιοψίας μυός δεν είναι σταθερά, είναι μη ειδικά και δεν βοηθούν στη διάγνωση.

Όταν σχηματιστούν αντισώματα, οι λεπτόσπειρες εξαφανίζονται από όλα τα όργανα του ξενιστή πλην του οφθαλμού, των εγγύς νεφρικών σωληναρίων και ίσως του εγκεφάλου, όπου είναι πιθανόν να παραμείνουν επί εβδομάδες ή μήνες. Η παραμονή των λεπτοσπειρών στο υδατοειδές υγρό ενίοτε προκαλεί χρόνια ή υποτροπιάζουσα ραγοειδίτιδα. Η συστηματική ανοσοποιητική απάντηση είναι αποτελεσματική στην καταπολέμηση του μικροοργανισμού αλλά μπορεί επίσης να προκαλέσει συμπτωματικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Μια αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων συμπίπτει με την ανάπτυξη μηνιγγίτιδας και ο συσχετισμός αυτός υποδηλώνει ότι είναι υπεύθυνος ο ανοσολογικός μηχανισμός.

Μετά την έναρξη της αντιμικροβιακής θεραπείας για τη λεπτοσπείρωση είναι πιθανόν να αναπτυχθεί μια αντίδραση Jarisch-Herxheimer, παρόμοια με αυτή που εμφανίζεται σε άλλες σπειροχαιτιακές νόσους. Μολονότι αναφέρεται συχνά σε

παλαιότερες δημοσιεύσεις, αυτή η αντίδραση φαίνεται ότι είναι σπάνιο συμβάν στη λεπτοσπείρωση και οπωσδήποτε λιγότερο συχνή από ότι σε άλλες σπειροχαιτιακές νόσους [18,19].

4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η λεπτοσπείρωση εμφανίζεται ως δύο διακριτά κλινικά σύνδρομα, την ανικτερική και την ικτερική λεπτοσπείρωση. Το πιο συχνό σύνδρομο είναι η ανικτερική λεπτοσπείρωση, μία αυτοπεριοριζόμενη συστηματική νόσος, η οποία παρατηρείται περίπου στο 85-90% των περιπτώσεων. Υπάρχουν δύο σαφώς καθοριζόμενα στάδια στην ανικτερική λεπτοσπείρωση: το στάδιο της σηψαιμίας ή λεπτοσπειραιμικό στάδιο και το άνοσο ή λεπτοσπειρουρικό στάδιο. Η ικτερική λεπτοσπείρωση ή σύνδρομο Weil είναι μία σοβαρή και δυνητικά θανατηφόρος νόσος, η οποία παρατηρείται στο 5-10% των περιπτώσεων. Ο καθορισμός ανάμεσα στο σηψαιμικό και το άνοσο στάδιο δεν είναι τόσο σαφής σε αυτό το σύνδρομο. Αν και η υποκλινική λοίμωξη είναι σπάνια, αποτελέσματα ορολογικών εξετάσεων έδειξαν ότι εμφανίζεται σε μερικούς εργάτες οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε λεπτόσπειρες [20].

4.1 Ανικτερική λεπτοσπείρωση

Η περίοδος επώασης της λεπτοσπείρωσης είναι συνήθως 7-12 ημέρες, αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 2 έως 20 ημέρες. Η έναρξη της α' φάσης (σηψαιμικής) της ανικτερικής λεπτοσπείρωσης είναι αιφνίδια και χαρακτηρίζεται από πυρετό, κεφαλαλγία, έντονες μυαλγίες, ρίγος και μερικές φορές κυκλοφορική καταπληξία. Ο πυρετός είναι υψηλός (38,5-39°C) και υποτροπιάζει. Η κεφαλαλγία είναι έντονη, συνήθως μετωπιαία, μερικές φορές σφύζουσα και συνήθως δεν υποχωρεί με παυσίπονα. Ανορεξία, ναυτία, έμετοι και κοιλιακός πόνος παρατηρούνται στους περισσότερους ασθενείς. Άλλα σημεία που μπορεί να εμφανισθούν είναι κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα, υπεραιμία του φάρυγγα, λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία, και μυϊκή ευαισθησία. Τα συμπτώματα είναι έντονα για 4-7 ημέρες κατά τη διάρκεια της σηψαιμικής φάσης στο τέλος της οποίας παρατηρείται απυρεξία εξαιτίας λύσης των μικροοργανισμών. Σε αυτή τη φάση οι λεπτόσπειρες μπορεί να απομονωθούν από το αίμα και το ENY. Πριν από την άνοση (ή δεύτερη) φάση της ανικτερικής λεπτοσπείρωσης, προηγείται

μία ασυμπτωματική περίοδος 1-3 ημερών. Η έναρξη της άνοσης φάσης συμπίπτει με την εμφάνιση IgM αντισωμάτων. Η συμπτωματολογία σε αυτό το στάδιο ποικίλλει. Ο πυρετός, η κεφαλαλγία και οι έμετοι είναι μικρότερης έντασης στην άνοση φάση σε σύγκριση με τη σηψαιμική. Η διάρκεια αυτής της φάσης ποικίλλει από 4-30 ημέρες, ενώ οι λεπτόσπειρες εξαφανίζονται από το αίμα και το ENY μετά τις πρώτες 1-2 ημέρες αυτής της φάσης. Παράλληλα εμφανίζεται λεπτοσπειρουρία που επιμένει για 1-3 εβδομάδες (σπάνια μέχρι 3 μήνες). Η άσηπτη μηνιγγίτιδα είναι η κύρια εκδήλωση της νόσου στο άνοσο στάδιο. Υπάρχει μέτρια πλειοκυττάρωση με ή χωρίς μηνιγγικά σημεία και συμπτώματα [20,21].

4.2 Ικτερική λεπτοσπείρωση (Νόσος Weill)

Η ικτερική λεπτοσπείρωση ή σύνδρομο Weil είναι μία μορφή της νόσου που χαρακτηρίζεται από ηπατική, νεφρική και αγγειακή δυσλειτουργία. Τα κλινικά ευρήματα ποικίλλουν σε βαρύτητα. Σε μερικούς ασθενείς με ίκτερο μπορεί να μην εμφανισθεί νεφρική προσβολή. Η υποστηρικτική θεραπεία έχει ελαττώσει τη θνητότητα στο 5-10%. Όλοι οι ορότυποι της *Leptospira interrogans* μπορεί να προκαλέσουν ικτερική λεπτοσπείρωση [3].

Εργαστηριακά ευρήματα της νόσου Weill: Κατά τη διάρκεια της λεπτοσπειραιμικής φάσης της ικτερικής λεπτοσπείρωσης τα συμπτώματα συνήθως δεν υποδηλώνουν λεπτοσπείρωση μέχρι την τρίτη με τέταρτη ημέρα της νόσου, οπότε και εμφανίζεται ο ίκτερος και η αζωθαιμία. Τα επίπεδα της χολερυθρίνης είναι συνήθως αυξημένα. Η νεφρική προσβολή είναι συχνή τόσο στην ικτερική όσο και στην ανικτερική λεπτοσπείρωση. Ωστόσο, συμπτώματα που σχετίζονται με τη νεφρική προσβολή εμφανίζονται μόνο στην ικτερική μορφή της νόσου. Αζωθαιμία, ολιγουρία και ανουρία παρατηρούνται συχνά κατά τη διάρκεια της δεύτερης εβδομάδας της νόσου αλλά μπορεί να εμφανιστούν και νωρίτερα, 3-4 ημέρες από την έναρξη της νόσου. Η ουρία κυμαίνεται συνήθως στα κατώτερα φυσιολογικά επίπεδα (περίπου 18mg/dl). Η μικροσκοπική εξέταση των ούρων στο 70-80% των περιπτώσεων αναδεικνύει πρωτεϊνουρία, κυλίνδρους υαλώδεις ή κοκκώδεις, αιματοουρία και πυουρία. Η εμφάνιση ανουρίας είναι κακό προγνωστικό σημείο, ενώ η επανεμφάνιση της διούρησης υποδηλώνει ύφεση της νόσου. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της νεφρικής προσβολής είναι η αυξημένη κλασματική απέκκριση

του καλίου που εργαστηριακά εκφράζεται ως υποκαλαιμία. Η βλάβη πιθανολογείται ότι εντοπίζεται είτε στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια ή στο παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle. Η παρουσία υποκαλαιμίας σε ασθενείς με οξεία εμπύρετη συνδρομή και στοιχεία νεφρικής προσβολής απαιτεί τον αποκλεισμό λεπτοσπείρωσης από το διαφοροδιαγνωστικό πλαίσιο.

Υπόταση που οφείλεται σε κυκλοφορική καταπληξία παρατηρείται μόνο σε ασθενείς με ικτερική λεπτοσπείρωση. Σε βαριές περιπτώσεις εμφανίζεται αιμορραγική διάθεση που μπορεί να εκδηλωθεί με επίταξη, αιμόπτυση, αιμορραγία πεπτικού, αιμορραγία στα επινεφρίδια, υπαραχνοειδή αιμορραγία και αιμορραγική πνευμονίτιδα. Σπάνια παρατηρείται συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Ωστόσο, στους περισσότερους ασθενείς παρατηρούνται μη ειδικές ηλεκτροκαρδιογραφικές διαταραχές. Πρέπει να αναφερθεί συχνά διαπιστώνονται διαταραχές του επιπέδου συνείδησης [22].

Από τα εργαστηριακά ευρήματα σημειώνεται η αναιμία, η θρομβοπενία και τα αυξανόμενα επίπεδα της κρεατοφωσφοκινάσης (CPK). Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων κυμαίνεται και μπορεί να υπάρχει λευκοπενία ή μέτρια λευκοκυττάρωση στους ανικτερικούς ασθενείς. Στους ικτερικούς ασθενείς τα λευκά αιμοσφαίρια μπορεί να ξεπεράσουν τις 60000/mm³. ανεξάρτητα από τον ολικό αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, πολύ συχνά παρατηρείται πολυμορφοπυρήνωση (>70%). Στην ακτινογραφία θώρακα παρατηρούνται τρεις τύποι βλαβών: α)οζώδεις σκιάσεις, β)συρρέουσες ατελεκτασίες και γ)διάχυτες ασαφείς σκιάσεις. Οι βλάβες αυτές είναι αμφοτερόπλευρες, χωρίς λοβιακή κατανομή και κυρίως περιφερειακές. Η πλειοψηφία των ακτινογραφιών στα αρχικά στάδια φέρει οζώδεις σκιάσεις, ενώ συρρέουσες ατελεκτασίες ή σκιάσεις εμφανίζονται σε μεταγενέστερες ακτινογραφίες [23,24].

5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ - ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η αναζήτηση ειδικών αντισωμάτων είναι η πλέον διαδεδομένη μέθοδος της κλινικής διάγνωσης της λεπτοσπείρωσης. Η άμεση ανίχνευση με μικροσκοπική εξέταση και καλλιέργεια δεν εφαρμόζεται ευρέως στα διάφορα κλινικά εργαστήρια, διότι απαιτεί εμπειρία και ειδικά καλλιεργητικά υλικά. Σήμερα, επιχειρείται η μοριακή διάγνωση [24].

Συνοπτικά οι μέθοδοι διάγνωσης της λεπτοσπείρωσης περιλαμβάνουν:

A) Μικροσκοπική εξέταση κλινικού δείγματος.

B) Καλλιέργεια.

Γ) Ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων στον ορό του ασθενή.

Δ) Ανίχνευση του μικροοργανισμού με μοριακή τεχνική σε κλινικά δείγματα (ENY/αίμα/).

A) Μικροσκοπική εξέταση. Επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του μικροσκοπίου σκοτεινού πεδίου, τη μέθοδο του άμεσου ανοσοφθορισμού και ειδικών χρώσεων (Wartin-Starry). Ως κατάλληλα κλινικά υλικά αναφέρονται το αίμα με αντιπηκτικό (κατά την πρώτη φάση της νόσου), στο ENY, στα ούρα και ο ομογενοποιημένος ιστός μετά από διαφορική φυγοκέντρηση. Αναζητείται η λεπτόσπειρα ζωντανή κινούμενη στο αίμα (κατά την πρώτη φάση της νόσου) το ENY και τα ούρα. Συνήθως οι λεπτόσπειρες είναι ταλαιπωρημένες από τις φυγοκεντρήσεις που απαιτούνται και δεν αναγνωρίζονται. Στα ίδια κλινικά δείγματα μπορεί να αναζητηθεί η λεπτόσπειρα με άμεσο ανοσοφθορισμό αλλά χρειάζονται ειδικοί αντι-οροί.

Η μικροσκοπική μέθοδος έχει πολύ χαμηλή ευαισθησία λόγω του μικρού αριθμού (συνήθως $<10^4$ /ml) λεπτοσπειρών στα κλινικά υλικά αλλά και του μικρού χρονικού διαστήματος που κυκλοφορούν (συνήθως λίγες ημέρες) [25,26].

B) Καλλιέργεια. Η καλλιέργεια των λεπτοσπειρών από ολικό αίμα, ENY και ούρα επιτυγχάνεται σε ειδικά ημιστερεά ή υγρά θρεπτικά υλικά, όπως το ημισκλήρο υλικό Fletcher (εικόνα 5) που είναι θρεπτικός ζωμός που περιέχει ορό αίματος κουνελιού 10% και άγαρ 1,5g/L. Το υλικό Korthof είναι και αυτό θρεπτικός ζωμός με πολλά ρυθμιστικά άλατα και 10% ορό κουνελιού. Προκειμένου για ούρα ή άλλα υλικά με χλωρίδα μπορεί να προστεθούν αντιβιοτικά όπως μίγμα φωσφομυκίνης (400μg/ml) και 5-φλουορουρακίλης (100μg/ml). Άλλο υλικό είναι αυτό όπου αντί του ορού κουνελιού προστίθεται βόειος αλβουμίνη και Tween 80, είτε υγρό, είτε ημίσκληρο. Εμβολιάζονται τέσσερα τουλάχιστον σωληνάκια. Η επώαση γίνεται στους 30 °C ή και σε θερμοκρασία δωματίου.

Καλλιέργεια αίματος πρέπει να λαμβάνεται αμέσως μετά την είσοδο του ασθενή στο νοσοκομείο. Επίσης το ENY και τα διδρώματα καλλιεργούνται την πρώτη εβδομάδα της λοίμωξης, ενώ τα ούρα τη δεύτερη. Η διάρκεια της λεπτοσπειρουρίας ποικίλλει, μπορεί όμως να διαρκέσει μερικές εβδομάδες.



Εικόνα 5: Καλλιέργεια λεπτόσπειρας σε τρυβλίο.

Λόγω της μεγάλης χρονικής διάρκειας αναπαραγωγής της λεπτόσπειρας (7-16 ώρες) οι καλλιέργειες πρέπει να παρακολουθούνται για αρκετά μεγάλο διάστημα, διαβάζονται μετά από τέσσερις ή 6 ημέρες και στις δύο πρώτες εβδομάδες το θετικό αποτέλεσμα είναι ανιχνεύσιμο, το αρνητικό επιβεβαιώνεται μετά από επώαση τεσσάρων μηνών. Οι καλλιέργειες πρέπει να παρακολουθούνται ανά εβδομάδα [27]. Σε ημίσκληρα υλικά η ανάπτυξη εμφανίζεται σαν ένας θολός δίσκος λίγο κάτω από την ελεύθερη επιφάνεια του υλικού ενώ στα υγρά υλικά σαν διάχυτη θολερότητα. Από το θολερό δίσκο ή τη διάχυτη θολερότητα μεταφέρεται μια ρανίδα σε αντικειμενοφόρο πλάκα, καλύπτονται με καλυπτρίδα και εξετάζεται σε σκοτεινό οπτικό πεδίο με ξηρό φακό (x 450). Οι λεπτόσπειρες θα αναγνωριστούν από τη χαρακτηριστική κινητικότητά τους που είναι πιο ζωνή στο δείγμα απ'ότι στην καλλιέργεια στο υγρό υλικό. Γίνεται ανακαλλιέργεια 0,5-1ml σε νέο υγρό και ημίσκληρο υλικό.

Ανακαλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υλικό δοκιμάζεται με αρκετή επιτυχία, καθώς και σε BACTEC σύστημα για μυκοβακτηρίδια. Η καλλιέργεια είναι πιο αξιόπιστη διαγνωστική μέθοδος αλλά δεν μπορεί να γίνει στα συνήθη νοσοκομειακά μικροβιολογικά εργαστήρια. Καλλιέργεια γίνεται και σε υλικά (ιστοί ή ούρα) ζώων για κτηνιατρικές και επιδημιολογικές μελέτες.

Η τυποποίηση της λεπτόσπειρας που αναπτύχθηκε γίνεται με τη χρήση 12 ειδικών αντιωρών [28].

Αντιγονική σύσταση: Διάφορες αντιγονικές ουσίες έχουν απομονωθεί από τις λεπτόσπειρες με ποικίλες χημικές και φυσικές μεθόδους. Οι ουσίες αυτές έχουν ειδικότητα είδους ή γένους όπως έχει αποδειχθεί με διάφορες ορολογικές τεχνικές. Η εντόπιση των ουσιών αυτών καθώς και ο ρόλος τους στη λοιμογόνο δράση του μικροοργανισμού και στην ανοσία δεν έχουν διευκρινισθεί. Οι παθογόνες λεπτόσπειρες χαρακτηρίζονται από την παρουσία συγκολλητινιγόνου, το οποίο αποτελεί τη βάση για τη διάκριση μεταξύ τους. Το συγκολλητινιγόνο αυτό εντοπίζεται στο περίβλημα, το οποίο αποτελείται από λιπίδια, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Από πολλά στελέχη έχει απομονωθεί ένας πολυσακχαρίτης με ειδικότητα ομάδας. Με βάση τα αποτελέσματα συγκολλητινοαντιδράσεων, διασταυρούμενων αντιδράσεων και προσροφήσεων έχουν καθοριστεί οι ορότυποι (serovars), οι οποίοι αποτελούν το βασικό σύστημα ταξινόμησης. Οι ορότυποι αυτοί με βάση το "μείζον" αντιγόνο έχουν καταταγεί σε 20 ορό-ομάδες, οι οποίες χρησιμεύουν σαν μέσον επιλογής των αντιορών και των αντιγόνων για την ταυτοποίηση των απομονούμενων στελεχών και την αναζήτηση αντισωμάτων. Τελευταίως για την ταξινόμηση των στελεχών χρησιμοποιείται η μέθοδος της περιοριστικής ενδονουκλεάσης (restriction endonuclease analysis).

Γ) Ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων στον ορό του ασθενή

Ανοσιακή απάντηση: Λοίμωξη με ένα ορότυπο δημιουργεί ανοσία έναντι του ίδιου ορότυπου, όχι όμως έναντι αντιγονικά διαφόρων ορότυπων. Μερική προφύλαξη σχετίζεται με παρουσία κοινού "μείζονος" συγκολλητινιγόνου.

Τα αντισώματα (συγκολλητίνες, οψονίνες κλπ). Εμφανίζονται προς το τέλος της πρώτης εβδομάδας της νόσου και φτάνουν στον ανώτατο τίτλο την τρίτη έως τέταρτη εβδομάδα. Αντίστοιχα ο τίτλος των αντισωμάτων πέφτει, άλλα αντισώματα εξακολουθούν να ανιχνεύονται για δύο χρόνια ή και περισσότερο.

Ανοσολογικοί επίσης μηχανισμοί, όπως ανοσοσυμπλέγματα, μπορεί να ευθύνονται για επιπλοκές της νόσου, που παρατηρούνται μετά την πρώτη εβδομάδα [29,30].

Αναζήτηση αντισωμάτων

Η αναζήτηση αντισωμάτων γίνεται όχι μόνο για διάγνωση της λεπτοσπειρώσεως στον άνθρωπο, αλλά και στα ζώα και για επιδημιολογικές έρευνες. Οι ορολογικές μέθοδοι είναι περισσότερο ευαίσθητες και κυρίως ευκολότερα εφαρμόσιμες,

συγκριτικά με τη μικροσκοπική εξέταση και τις μοριακές τεχνικές, δεν μπορούν όμως να ξεχωρίσουν την παλαιά από την πρόσφατη λοίμωξη της. Επίσης το χρονικό διάστημα της ορομεταστροφής κυμαίνεται από 3-14 ημέρες, ενώ στο 10% των περιπτώσεων παρατηρείται μετά από ένα μήνα.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των ειδικών έναντι λεπτόσπειρας αντισωμάτων είναι:

1) Μέθοδος συγκόλλησης σωματιδίων latex

Η μέθοδος συγκόλλησης σωματιδίων latex χρησιμοποιείται για τον έλεγχο αντισωμάτων. Τα σωματίδια latex καλύπτονται με αντιγόνο, μετά προσθέτουμε τον ορό του ασθενή ο οποίος περιέχει αντισώματα κατά του συγκεκριμένου μικροοργανισμού και προκαλείται συγκόλληση ορατή δια γυμνού οφθαλμού [31].

2) Μικροσυγκόλληση

Σαν αντιγόνο χρησιμοποιείται νεαρό καλλιέργημα 4-7 ημερών, το οποίο ελέγχεται μικροσκοπικά σε σκοτεινό πεδίο ως προς την ομογένεια και την πυκνότητα, που προσδιορίζεται νεφελομετρικά ή με καταμέτρηση σε ειδική πλάκα. Το αντιγόνο χρησιμοποιείται ζωντανό ή μετά από κατεργασία με φορμόλη(0,3%), οπότε μπορεί να διατηρηθεί 1-2 εβδομάδες στους 4 °C. Συνήθως χρησιμοποιούνται 8-15 ορότυποι (*autumnalis*, *grippotyphosa*, *caniaola*, *Pomona*, *wolffi*, *copenhageni*, *djatzi*, *patoc*). Ο κατάλογος των στελεχών μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την περιοχή, αλλά και μερικά στελέχη να αντικαθίστανται με τοπικά απομονωθέντα στελέχη. Ίσοι όγκοι διαδοχικών αραιώσεων ορού και αντιγόνου τοποθετούνται σε σωληνάρια ή μικροπλακίδια και μετά από ανακίνηση, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και νέα ανακίνηση, ακολουθεί η ανάγνωση που γίνεται σε σκοτεινό πεδίο. Ο τίτλος της θετικής αντίδρασης ισούται με την μεγαλύτερη αραιώση που δείχνει συγκόλληση των λεπτοσπειρών σε αναλογία 50% ή παραπάνω. Συνήθως ο τίτλος φτάνει σε πολύ υψηλές τιμές (12800-25600), αλλά γενικά τίτλος σε ένα δείγμα ≥ 1600 είναι ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης. Προτιμότερη είναι η εξέταση ζεύγους ορών με μεσοδιάστημα 15 ημερών και η διαπίστωση τετραπλάσιας ή παραπάνω αύξησης του τίτλου.

3) Συγκόλληση σε πλάκα

Το αντιγόνο είναι εναιώρημα 12 συνήθως ορότυπων, που έχει νεκρωθεί με φορμόλη. Διατηρείται για αρκετούς μήνες στο ψυγείο και βρίσκεται στο εμπόριο. Η αντίδραση γίνεται σε πλάκα και η ανάγνωση μικροσκοπικά. Η μέθοδος είναι απλή, ικανοποιητικής ειδικότητας και ευαισθησίας. Ο τίτλος συνήθως δεν υπερβαίνει το 1/160.

Παραλλαγή της μεθόδου συγκολλητινοαντίδρασης επίσης σε πλάκα στην οποία όμως χρησιμοποιείται θερμοανθεκτικό αντιγόνο του ορότυπου *patoc* της *L. biflexa* κατεργασμένο με φορμόλη. Το αντιγόνο δεν βρίσκεται στο εμπόριο. Ο τίτλος συνήθως δεν υπερβαίνει το 1/512. Συνήθως χρησιμοποιείται σαν μέθοδος διαλογής (screening) και είναι χρήσιμη για έρευνα οξείας ή πρόσφατης λεπτοσπείρωσης.

4) Σύνδεση συμπληρώματος

Είναι ευαίσθητη και εφικτή μέθοδος σε κάθε εργαστήριο γιατί το αντιγόνο της (*L. biflexa*) προσφέρεται στο εμπόριο.

Τα αντισώματα που έχουν συνδεθεί στο συμπλήρωμα εμφανίζονται νωρίτερα από τις συγκολλητίνες, δεν είναι τόσο ειδικά όσο αυτές και φυσικά δεν ξεχωρίζουν ορολογικούς τύπους αλλά μόνο το είδος της λεπτόσπειρας ανάλογα με το αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε.

Στο εμπόριο προσφέρονται αντιγόνα πέντε διαφορετικών ειδών λεπτόσπειρας.

5) Αιμολυτική αντίδραση

Ως αντιγόνο χρησιμοποιούνται ερυθρά αιμοσφαίρια καλυμμένα και ευαισθητοποιημένα με αντιγονικά λεπτοσπειρικά. Προστίθενται σε αραιώσεις του εξεταζόμενου ορού μαζί με σταθερή ποσότητα συμπληρώματος. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για μία ώρα. Αν στον ορό υπάρχουν αντισώματα προκαλείται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τίτλος $\geq 1/100$ θεωρείται ενδεικτικός.

6) Έμμεση αιμοσυγκόλληση

Αποτελεί παραλλαγή της αιμολυτικής αντίδρασης στην οποία τα ευαισθητοποιημένα ερυθρά αιμοσφαίρια μονιμοποιούνται και χρησιμοποιούνται σε μια αντίδραση αιμοσυγκόλλησης. Η μέθοδος έχει ειδικότητα ομάδας και είναι ευαίσθητη στα αρχικά στάδια της νόσου. Οι τίτλοι κυμαίνονται από 1/100-1/51.200.

7) Ανοσοενζυμική δοκιμασία - ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Η μέθοδος ELISA είναι η πλέον συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος στα διαγνωστικά εργαστήρια. Με τη μέθοδο αυτή ελέγχονται αντισώματα ειδικά έναντι του μικροοργανισμού στον ορό.

Εφαρμόζεται σε κλινικά διαγνωστικά εργαστήρια και είναι πιο ευαίσθητη από τη συγκολλητινοαντίδραση γιατί μπορεί να χρησιμοποιηθούν ειδικά προσροφημένα αντιγόνα. Επιπλέον διαχωρίζονται οι IgG από τις IgM ανοσοσφαιρίνες και αυτό επιτρέπει την αναγνώριση πρόσφατης ή παλιάς λοίμωξης.

Χρησιμοποιείται αντιγόνο από διάφορους ορότυπους ή από το στέλεχος *patoc* της *L. biflexa*. Τίτλος με τιμή μεγαλύτερη του 1/40 θεωρείται σημαντικός. Συνήθως οι τίτλοι που αναφέρονται κυμαίνονται μεταξύ 1/160-1/1280 [32].

Δ) Ανίχνευση του μικροοργανισμού με μοριακή τεχνική σε κλινικά δείγματα (ENY/ αίμα/ ιστό).

Μοριακές τεχνικές

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η ικανότητα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) να ανιχνεύει μικρή ποσότητα συγκεκριμένου DNA ή RNA σε διάφορα κλινικά δείγματα κατέστησε τη μέθοδο αυτή σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο. Με τη χρήση της PCR υπάρχει η δυνατότητα να ανιχνεύονται μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται αργά ή που βρίσκονται σε μικρό αριθμό ή ακόμη και μικροοργανισμοί που δεν καλλιεργούνται εύκολα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται πλέον ευρέως και στην ιατρική τόσο για διαγνωστικούς όσο και για ερευνητικούς σκοπούς.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιώντας μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο συνθέτει νέο συμπληρωματικό κλώνο. Απαραίτητο επομένως για την αντίδραση είναι το αρχικό γενετικό υλικό (δίκλωνο DNA) του στόχου το οποίο θα πρέπει να αποδιαταχθεί σε μονόκλωνες νουκλεοτιδικές αλυσίδες. Επίσης χρησιμοποιούνται κατάλληλα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές - primers), συμπληρωματικά της επιθυμητής ακολουθίας βάσεων. Η όλη διαδικασία γίνεται σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος, [μείγματος 2'-δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων $MgCl_2$]. Η αντίδραση ως θερμοεξαρτώμενη γίνεται σε ειδικά όργανα, τους θερμοκυκλοποιητές σε τρία στάδια:

1^ο Στάδιο: Αποδιάταξη (Denaturation)

Το δίκλωνο μόριο DNA αποδιατάσσεται σε υψηλή θερμοκρασία (90-95°C). Οι δύο μονόκλωνες νουκλεοτιδικές αλυσίδες που προκύπτουν είναι πλέον προσβάσιμες στους εκκινητές.

2^ο Στάδιο: Υβριδισμός (Annealing)

Με μείωση της θερμοκρασίας (50-64°C) επιτυγχάνεται η πρόσδεση των εκκινητών στο μονόκλωνο εκμαγείο του DNA μέσω δεσμών υδρογόνου. Δεσμεύεται η DNA πολυμεράση και αρχίζει η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου (επιμήκυνση). Η θερμοκρασία επιλογής σε αυτό το στάδιο είναι πολύ κρίσιμη, εξαρτάται από τη σύσταση και το μήκος των εκκινητών και είναι διαφορετική σε κάθε πρωτόκολλο εργασίας.

3^ο Στάδιο: Επιμήκυνση / Πολυμερισμός (Extension/Elongation)

Στο στάδιο αυτό, η DNA πολυμεράση, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τη μονόκλωνη αλυσίδα και αναγνωρίζοντας την ελεύθερη ομάδα -OH, συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα προσθέτοντας νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του εκκινητή. Η θερμοκρασία επιλογής γι' αυτό στάδιο εξαρτάται από τη DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται. Για την *Taq* πολυμεράση που συνήθως χρησιμοποιείται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης το βέλτιστο της δράσης της είναι οι 70-74°C, (συνήθως οι 72°C). Η διάρκεια του πολυμερισμού εξαρτάται από το μήκος της νουκλεοτιδικής αλυσίδας. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 30-40 φορές συνήθως και παράγονται 2ⁿ μόρια DNA [όπου (n) είναι ο αριθμός των κύκλων]. Στο τέλος των κύκλων, το μείγμα της αντίδρασης παραμένει για 10 min στους 72°C, ώστε να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός σε όλες τις αλυσίδες του DNA [33,34].

Παραλλαγές της PCR

Στην πορεία έγιναν πολλές τροποποιήσεις στη βασική αντίδραση της PCR, οι οποίες επεκτείνανε την χρήση των τεχνικών αυτών και διεύρυναν το φάσμα ανίχνευσης των μικροοργανισμών [35]. Σήμερα στο εμπόριο κυκλοφορούν πολλά εμπορικά kit για την ανίχνευση διαφόρων μικροοργανισμών. Αρκετές αναφορές κάνουν λόγο για διάφορες παραλλαγές της PCR για τη διάγνωση της λεπτόσπειρας σε βιολογικά δείγματα (αίμα, ούρα, ENY). Ανάμεσα στις παραλλαγές η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι οι πιο κάτω: η συμβατική PCR και η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time Quantitative-PCR).

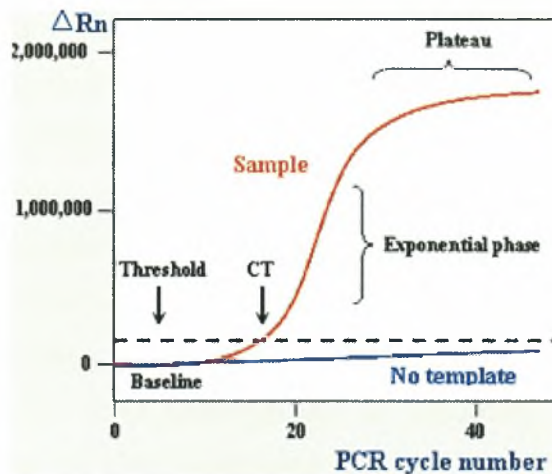
Real Time PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο)

Είναι μια μέθοδος που επιτρέπει την μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού της *Leptospiras* σε όλη τη διάρκεια της αντίδραση PCR. Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR, QPCR) είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικής PCR: η τελικού σημείου (end-point) και η πραγματικού χρόνου (Real-Time) PCR. Στην end-point PCR ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης, με εμφανές μειονέκτημα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, λόγω της κατανάλωσης των αντιδρώντων και της συσσώρευσης αναστολέων, κάτι που δυσχεραίνει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Αντίθετα, στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους.

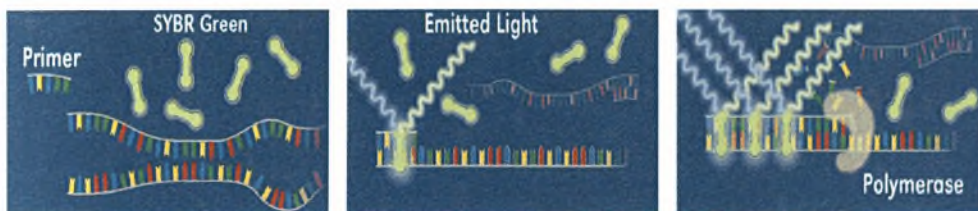
Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή C_t (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα

συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (εικόνα 6) [36].



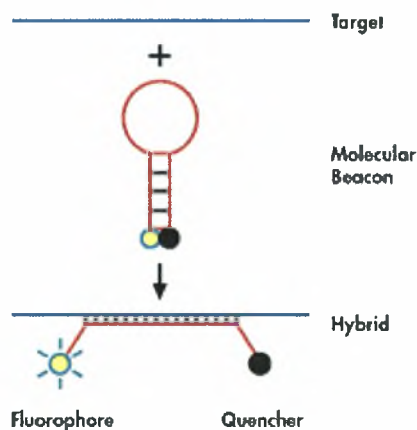
Εικόνα 6: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής Ct, ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο ‘θορύβου’ (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.

Ο προσδιορισμός του ποσότητας της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου βασίζεται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ουσίας η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Οι πρώτες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το βρωμιούχο αιθίδιο και το SYBR Green I (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green I. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως ολιγονουκλεοτιδικοί ιχνηθέτες οι οποίοι υβριδοποιούνται σε μια εσωτερική αλληλουχία του μορίου στόχου. Ο τύπος ανιχνευτή που χρησιμοποιείται ονομάζεται μοριακός φάρος (Molecular beacon). Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια που φέρουν στο ένα άκρο μια φθορίζουσα ουσία (FAM) και στο άλλο άκρο μια ομάδα απορρόφησης φθορισμού κατά αναλογία προς τα ολιγονουκλεοτίδια. Τα δυο άκρα του είναι συμπληρωματικά με αποτέλεσμα τη δημιουργία δομής φουρκέτας που φέρνει κοντά τη φθορίζουσα ουσία και της απορρόφησης, με αποτέλεσμα να μην παράγεται φθορισμός. Αυτό οφείλεται στη διαδικασία μεταφοράς ενέργειας μέσω απορρόφησης φθορισμού, FRET (Fluorescence Resonance energy Transfer) κατά την οποία η ακτινοβολία UV διεγείρει την φθορίζουσα ουσία, η οποία παράγει ενέργεια που απορροφάται από την ουσία απορρόφησης. Μόνο η αλλαγή της στεροδιαμόρφωσης της φουρκέτας οδηγεί στην παραγωγή φωτός. Αυτό επιτυγχάνεται με θέρμανση η οποία διασπά τους δεσμούς υδρογόνου και το τμήμα ευθυγραμμίζεται και γίνεται η ενίσχυση του με την πρόσδεση των εκκινήτων. Τώρα η UV διεγείρει την φθορίζουσα ουσία να παράγει φως [37] (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Αρχή της μεθόδου Molecular Beacon. Όταν το ολιγονουκλεοτίδιο βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα σχηματίζει μια δομή, η οποία αποτελείται από ένα δίκλωνο μίσχο και μία μονόκλωνη θηλιά. Η δομή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τα δύο μόρια χρωστικής, που βρίσκονται στα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου, να έρχονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο, κάτι που αποτρέπει την παραγωγή φθορισμού λόγω του φαινομένου FRET. Η πρόσδεση του ολιγονουκλεοτιδίου στο προϊόν της αντίδρασης συμβάλλει στην απομάκρυνση των δύο χρωστικών, στην αδυναμία εκδήλωσης του φαινομένου FRET και κατά συνέπεια στην παραγωγή φθορισμού.

6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Η λεπτόσπειρα βρίσκεται στη φύση στα στάσιμα νερά και στα διάφορα είδη ποντικών που αποτελούν και την αποθήκη των μικροοργανισμών. Από τη λεπτοσπείρωση πάσχουν πολλά άγρια και κατοικίδια ζώα, σκυλιά, πίθηκοι, γάτες, άλογα κτλ. Η μετάδοση των λεπτοσπειρών γίνεται από τα στάσιμα και ακάθαρτα νερά, τα οποία μολύνονται με τα ούρα των άρρωστων ζώων.

Η λεπτοσπείρωση υπάγεται στις επαγγελματικές αρρώστιες. Οι κολυμβητές των δεξαμενών και των ποταμών σε στάσιμα νερά, οι εργάτες υπονόμων και βόθρων, οι καθαριστές ψαριών και πτηνών, το προσωπικό κρεοπωλείων και γαλακτοπωλείων, οι κηπουροί, οι αγρότες και ιδιαίτερα οι καλλιεργητές ρυζιού διατρέχουν τον κίνδυνο να προσβληθούν από την επαγγελματική νόσο τους καλοκαιρινούς κυρίως μήνες. Γι' αυτό επιβάλλεται προληπτικά η εξόντωση των ποντικών, η εξυγίανση των υπονόμων, των σφαγίων, των στάσιμων νερών και η απαγόρευση της κολύμβησης στις λίμνες, στα ποτάμια και στις κολυμβητικές δεξαμενές, για τις οποίες υπάρχει υπόνοια να έχουν μολυνθεί τα νερά τους από ούρα άρρωστων ζώων και κυρίως ποντικών. Σε περίπτωση μικροεπιδημίας επιβάλλεται ο έλεγχος του νερού, που χρησιμοποιείται για την παρουσία λεπτόσπειρας. Επίσης επιβάλλεται η απολύμανση των ούρων και κοπράνων του πάσχοντα από λεπτοσπείρωση. Ακόμα επιβάλλεται ο προφυλακτικός εμβολιασμός στο περιβάλλον του αρρώστου κατά την εκδήλωση της λεπτοσπείρωσης με ειδικά εμβόλια.

Ως γενικό προφυλακτικό μέτρο θεωρείται ο εμβολιασμός των ζώων που οδηγούνται για εξημέρωση καθώς επίσης και των κατοικίδιων ζώων. Ωστόσο μερικά από τα ήδη ανοσοποιημένα με εμβόλια ζώα συνεχίζουν να απεκκρίνουν λεπτόσπειρες στα ούρα τους με αποτέλεσμα τη μετάδοση μικροβίων στον άνθρωπο.

Τα εμβόλια για ζώα που χρησιμοποιούνται σε μια περιοχή πρέπει να περιλαμβάνουν τους ορότυπους που είναι γνωστό ότι υπάρχουν σε αυτή την περιοχή. Σε μερικές χώρες της Ευρώπης και της Ασίας εφαρμόστηκε ο εμβολιασμός ανθρώπων εναντίον συγκεκριμένου ορότυπου που επικρατεί σε μια περιοχή και αποδείχθηκε αποτελεσματικός. Η χημειοπροφύλαξη με δοξυκυκλίνη (200 mg μια φορά την εβδομάδα) αποδείχθηκε αποτελεσματική στο στρατιωτικό προσωπικό αλλά ενδείκνυται μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις παρατεταμένης βραχυχρόνιας έκθεσης.

Στις επαγγελματικά εκτεθειμένες ομάδες συνίσταται η λήψη ειδικών μέτρων προστασίας, όπως η χρήση γαντιών, η χρήση προστατευτικών γυαλιών στους

οφθαλμούς και λαστιχένιες μπότες. Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι σε κάθε περιοχή στην οποία παρουσιάζονται κρούσματα λεπτοσπείρωσης πρέπει να γίνεται επιδημιολογική μελέτη, ώστε να είναι η λήψη προληπτικών μέτρων [14,38].

7. ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η πρόγνωση γενικά είναι καλή αλλά εξαρτάται από τη λοιμογόνο δύναμη του οργανισμού και τη γενική κατάσταση του ασθενή, η ηλικία είναι ο σημαντικότερος παράγοντας (που σχετίζεται με την αυξημένη θνησιμότητα). Η λοιμογόνος δύναμη της λεπτόσπειρας σχετίζεται με την εμφάνιση ή όχι ίκτερου, δηλαδή σε ανικτερικούς ασθενείς η θνητότητα είναι μηδενική ενώ σε ικτεροαιμοραγικούς ασθενείς ή νόσος weill η θνητότητα ανέρχεται σε ποσοστό που κυμαίνεται από 10% έως 30%.

Η πρόγνωση της οξείας νεφρικής βλάβης είναι καλή, αφού ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα συνήθως σε δύο μήνες. Ωστόσο, μερικοί ασθενείς εμφανίζουν υπολειμματική σωληναριακή δυσλειτουργία και κυρίως ελαττωματική ικανότητα συμπύκνωσης των ούρων. Η δοξυκυκλίνη σε δόση 200mg μια φορά την εβδομάδα είναι αποτελεσματική ως χημειοπροφύλαξη σε άτομα που έχουν εκτεθεί σε περιβάλλον με υψηλό κίνδυνο μετάδοσης της λεπτόσπειρας.

Ορισμένες θανατηφόρες περιπτώσεις οφείλονται σε άλλους λόγους όπως σε καρδιακή ανεπάρκεια, σε οξεία νεφρική ανεπάρκεια, σε πνευμονία ή σε άλλες επιπρόσθετες λοιμώξεις και σπανιότερα σε κυκλοφορική ανεπάρκεια, σε αιμορραγίες από το πεπτικό σύστημα ή σε υπαραχνοειδή αιμορραγία και σε οξεία επινεφριδική ανεπάρκεια. Γι' αυτό όπως έχουμε αναφέρει παίζει σημαντικό ρόλο η ηλικία και η κατάσταση του ασθενή [39].

8. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Είναι μια σχετικά περίπλοκη διαδικασία η οποία αποτελείται από δύο φάσεις, της καταστολής του αιτιολογικού παράγοντα και αγώνας για τις πιθανές επιπλοκές.

Η υποστηρικτική θεραπεία και η στενή παρακολούθηση των πασχόντων είναι ουσιαστικής σημασίας για την ανίχνευση και την αντιμετώπιση των επιπλοκών, όπως της αφυδάτωσης, της υπότασης, της αιμορραγίας και της νεφρικής ανεπάρκειας. Αν και οι διαταραχές της νεφρικής λειτουργίας διορθώνονται αυτόματα στις περισσότερες περιπτώσεις, ορισμένοι ασθενείς χρειάζονται εξωνεφρική κάθαρση (τεχνητός νεφρός ή περιτοναϊκή διύλιση). Η χορήγηση βιταμίνης Κ διορθώνει την υποπροθρομβιναιμία.

Σε ειδικές περιπτώσεις, η υποστηρικτική θεραπεία αποτοξίνωση του οργανισμού και ομαλοποίηση της οξεοβασικής ισορροπίας, μπορεί να γίνει με διαλύματα γλυκόζης και άλας, που μπορεί να χορηγηθούν. Η αύξηση του καλίου στον ορό είναι σύνηθες φαινόμενο και αν τα επίπεδα του είναι πολύ υψηλά, ειδικά μέτρα πρέπει να ληφθούν. Τα επίπεδα του φωσφόρου στον ορό μπορεί παρομοίως να αυξηθούν σε μη αποδεκτά επίπεδα και αυτό μπορεί να οφείλεται σε νεφρική ανεπάρκεια. Η θεραπεία για την υπερφωσφατασεμία αποτελείται από τη διάσπαση του ή στοματική χορήγηση ανθρακικού ασβεστίου, αλλά όχι χωρίς να ελέγξουμε πρώτα τα επίπεδα ασβεστίου στον ορό.

Οι ασθενείς με βαριά λεπτοσπείρωση και νεφρική ανεπάρκεια είναι πιθανό να χρειαστούν αιμοκάθαρση. Αυτοί που έχουν σύνδρομο Weill μπορεί να χρειαστούν μεταγγίσεις πλήρους αίματος ή και αιμοπεταλίων. Είναι πιθανόν να απαιτηθεί εντατική θεραπεία [40].

Η χορήγηση κορτικοστεροειδών με βαθμιαία ελαττωμένη δόση (ξεκινώντας από 30-60 mg) για 7 έως 10 ημέρες, συνίσταται σε ειδικές περιπτώσεις αιμορραγίας. Η θεραπεία για κάποια όργανα που μπορεί να επηρεαστούν είναι απαραίτητη, όπως προβλήματα στα νεφρά, στο ήπαρ ή στην καρδιά κτλ [38].

Σε σοβαρές περιπτώσεις λεπτοσπείρωσης, συνιστάται η ενδοφλέβια χορήγηση πενικιλίνης, αμοξικιλίνης, αμπικιλίνης ή ερυθρομυκίνης. Σε ηπιότερες περιπτώσεις, μπορεί να εφαρμοστεί από το στόμα χορήγηση τετρακυκλίνης, δοξυκυκλίνης, αμπικιλίνης ή αμοξικιλίνης. Μολονότι και πολλά άλλα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των νεότερων κεφαλοσπορινών, είναι πολύ αποτελεσματικά

in vitro εναντίον των λεπτοσπειρών, δεν υπάρχει ακόμα κλινική εμπειρία με αυτά τα φάρμακα.

Σε σπάνιες περιπτώσεις, αναπτύσσεται αντίδραση Jarisch- Herxheimer εντός ωρών από την έναρξη της αντιμικροβιακής θεραπείας. Ο μόνος αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης αυτής της αντίδρασης είναι υποστηρικτικός.

Οι περισσότεροι ασθενείς με λεπτοσπείρωση αναρρώνουν. Η θνητότητα είναι υψηλή μεταξύ των ηλικιωμένων ασθενών και εκείνων με σύνδρομο Weill. Η λεπτοσπείρωση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης συνοδεύεται από υψηλή θνησιμότητα του εμβρύου. Η μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια και ηπατική δυσλειτουργία έδειξε καλή αποκατάσταση της νεφρικής και ηπατικής λειτουργίας [41].

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Οι μοριακές τεχνικές πρόσφατα άρχισαν να εφαρμόζονται για τη διάγνωση της λεπτοσπείρωσης, αλλά στις λίγες μελέτες που έχουν δημοσιευτεί δεν έχει σαφές αν πλεονεκτούν ή όχι των κλασσικών μικροβιολογικών μεθόδων.

Στη μέχρι σήμερα κλασσική διαγνωστική προσέγγιση της λεπτοσπείρωσης εφαρμόζεται σε πρώτη γραμμή η δοκιμασία της μικρο-συγκόλλησης καθώς και η δοκιμασία ELISA και η εξέταση φθορισμού των αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς.

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η εφαρμογή μοριακής μεθόδου για την διάγνωση της λεπτοσπείρωσης και σύγκριση με κλασσικές μικροβιολογικές προσεγγίσεις.

Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν είναι η PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης), η Real-Time PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο) και η ELISA (Ανοσοενζυμική δοκιμασία για τον προσδιορισμό ανθρωπίνων αντισωμάτων IgG/ IgM).

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν δείγματα που συγκεντρώθηκαν το διάστημα μεταξύ Απρίλιος 2009 – Ιανουάριος 2010 από ασθενείς του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ).

Από αυτή την μελέτη συνολικά εξετάστηκαν 60 δειγμάτα (αίμα,ούρα,ΕΝΥ) ασθενών με κλινική εικόνα λεπτοσπείρωσης.

2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΛΑΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

2.1.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αντισωμάτων αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1

Στοιχεία δοκιμασίας και σύνθεση

Τυποποιημένος ορός (έτοιμος προς χρήση)

Ανθρώπινος ορός σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με πρωτεΐνη, αρνητικός για anti-HIVAK, anti-HBs-Ag (Ιός Ηπατίτιδας Β—αντιγόνο επιφάνειας) και anti-HCV-AK. Συντηρητικά μέσα: < 0.1 % Αζωτούχο Νάτριο
Χρωστική ουσία: Αμάρανθος Ο

Ορός ελέγχου- αρνητικός (έτοιμος προς χρήση)

Ανθρώπινος ορός σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με πρωτεΐνη, αρνητικός για anti-HIVAK, anti-HBs-Ag (Ιός Ηπατίτιδας Β—αντιγόνο επιφάνειας) και anti-HCV-AK. Συντηρητικά μέσα: < 0.1 % Αζωτούχο Νάτριο
Χρωστική ουσία: πράσινο λισαμίνης V

Αντιανθρώπινη-IgG-, IgA-, IgM-σύζευξη (έτοιμη προς χρήση)

Πολυκλωνικά αιγοαντισώματα κατά ανθρωπίνων IgG, IgA, IgM, συζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση, σταθεροποιημένα σε πρωτεϊνούχο, σταθεροποιητικό διάλυμα
Συντηρητικά μέσα: 0,01 % μεθυλισοθειαζόλιο
0,01 % Bromnitrodioxan

Συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης (επαρκεί για 1000 ml)

Διάλυμα Νατροχλωριδίου με Tween 20, 30 mM Tris
Συντηρητικά μέσα: < 0.1 % νατραζίδιο

Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με πρωτεΐνη και Tween 20,
Συντηρητικά μέσα: < 0.1 % νατραζίδιο
0,01 g/l κυανούν της βρωμιούχου φαινόλης άλας νατρίου

Διάλυμα πάυσης

1,2 N διάλυμα καυστικού νατρίου

Υπόστρωμα (έτοιμο προς χρήση)

φωσφορικό άλας παρανιτροφαινυλίου, ρυθμιστικό διάλυμα άνευ διαλυτικού μέσου

Συντηρητικά μέσα: < 0,1 % νατραζίδιο

Πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου με τυποποιημένη καμπύλη και πίνακα τιμών

(Ποσοτική αναφορά των αντισωμάτων σε IU/ml ήτοιU/ml)

↓ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ

- Συνήθης εξοπλισμός εργαστηρίου
- Φασματοσκοπικό φωτόμετρο για μικροπλάκες τίτλου με φίλτρο μήκους κύματος 405 nm, συνιστούμενο μήκος κύματος αναφοράς μεταξύ 620 nm - 690 nm
- Επωαστικός κλίβανος 37°C
- Υγρός θάλαμος
- Απεσταγμένο ύδωρ

2.1.2 Ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων

Αρχή δοκιμασίας

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση αυτών των ειδικών αντισωμάτων είναι η **SERION ELISA classic [ανοσοενζυματική δοκιμασία για τον προσδιορισμό ανθρωπίνων αντισωμάτων IgG / IgM]** (εμπορικό kit της εταιρίας virion/serion {Würzburg}).

Κατά την έμμεση τεχνική ELISA επιστρώνονται οι δοκιμαστικές λωρίδες με το αντίστοιχο αντιγόνο. Τα εξειδικευμένα αντισώματα που περιέχονται στο δείγμα του ασθενή δεσμεύονται με το υπάρχον αντιγόνο σταθερής φάσης.

Προκειμένου να γίνει ορατή η αντίδραση του ορού, χρησιμοποιούνται αντισώματα εξακρίβωσης, τα οποία σηματοδούνται με αλκαλική φωσφατάση, και τα οποία απευθύνονται σε θετικά περιστατικά, κατά των ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών του αντιγόνου που περιέχεται στο δείγμα του ασθενή. Εάν προστεθεί το υπόστρωμα (φωσφορικό άλας παρανιτροφαινυλίου), διακρίνουμε μία αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος, με αποτέλεσμα να έχουμε ένα κίτρινο χρωματισμένο τελικό προϊόν. Η ένταση της κίτρινης απόχρωσης καθορίζεται με φωτομέτρηση και είναι ανάλογη της περιεκτικότητας σε εξειδικευμένα αντισώματα.

Πειραματική διαδικασία

1. Τοποθετούμε τον απαιτούμενο αριθμό κοιλοτήτων στο πλαίσιο δοκιμασίας και συντάσσετε το φύλλο πρωτοκόλλου.

2. Διανέμουμε με την πιπέτα από 100μl των αραιωμένων δειγμάτων ενδεχ. των ορών ελέγχου στις αντίστοιχες κοιλότητες της δοκιμαστικής λωρίδας. Αφήνουμε μία κοιλότητα κενή για την τιμή του κενού υποστρώματος, π.χ.:

IgG/IgM ποσοτικά αντιγόνο-κοιλότητες	
Κοιλότητα A1	Τιμή κενού υποστρώματος
Κοιλότητα B1	Αρνητικός ορός ελέγχου
Κοιλότητα C1 Κοιλότητα D1	Πρότυπος ορός
Κοιλότητα E1	Πρότυπος ορός
	Ασθενής 1

3. Επώαση δειγμάτων για 60 λεπτά (+/- 5 λεπτά) στους 37°C (+/- 1°C) στον υγρό θάλαμο.

4. Μετά το τέλος του χρόνου επώασης πλένουμε τις κοιλότητες (με συσκευή πλύσης ή με το χέρι):

- ✓ Κάνουμε αναρρόφηση του υγρού επώασης από τις κοιλότητες ή απλά το αδειάζουμε
- ✓ Γεμίζουμε σε κάθε κοιλότητα 300 μl διάλυμα πλύσης
- ✓ Κάνουμε αναρρόφηση του διαλύματος πλύσης ή απλά το αδειάζουμε
- ✓ Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία 3 φορές (δηλαδή πλένουμε συνολικά 4 φορές)
- ✓ Αδειάζουμε τα τυχόν υπολείμματα της πλάκας πάνω σε απορροφητικό χαρτί

5. Προσθήκη σύζευξης

Βάζουμε με την πιπέτα 100 μl της έτοιμης προς χρήση IgG-/IgM-/IgA- σύζευξης στις αντίστοιχες κοιλότητες (συμπεριλαμβανομένου της τιμής του κενού υποστρώματος).

6. Επώαση σύζευξης για 30 λεπτά (+/- 1 λεπτό) στους 37°C (+/- 1°C) στον υγρό θάλαμο.

7. Μετά το τέλος του χρόνου επώασης πλένουμε τις κοιλότητες (όπως προαναφέρεται).

8. Προσθήκη υποστρώματος

Βάζουμε με την πιπέτα ανά 100 μl έτοιμο προς χρήση διάλυμα υποστρώματος σε όλες τις κοιλότητες (συμπεριλαμβανομένου της τιμής του κενού υποστρώματος).

9. Επώαση υποστρώματος για 30 λεπτά (+/- 1 λεπτό) στους 37°C (+/- 1°C) στον υγρό θάλαμο.

10. Παύση της αντίδρασης

Βάζουμε με την πιπέτα ανά 100 μl διαλύματος παύσης σε όλες τις κοιλότητες, ανακινούμε ελαφρά την μικροπλάκα του διαλύματος προκειμένου να επιτευχθεί μία καλή μίξη.

11. Μέτρηση της απορρόφησης

Εντός 60 λεπτών σε 405 nm έναντι της τιμής του κενού υποστρώματος, μήκος κύματος αναφοράς μεταξύ 620 nm και 690 nm (π.χ. 650 nm).

2.1.3 Κριτήρια εγκυρότητας δοκιμασίας

- Η τιμή του κενού υποστρώματος θα πρέπει να είναι $OD < 0,25$.
- Ο αρνητικός έλεγχος πρέπει στην αξιολόγηση της δοκιμασίας να αξιολογηθεί ως αρνητικός.
- Σε ποσοτικούς προσδιορισμούς SERION ELISA *classic* θα πρέπει η μέση τιμή OD του τυποποιημένου ορού, μετά την αφαίρεση της τιμής του κενού υποστρώματος, να βρίσκεται εντός της περιοχής εγκυρότητας, η οποία αναφέρεται στο ειδικό για την παρτίδα πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου.
- Σε ποιοτικούς προσδιορισμούς SERION ELISA *classic* θα πρέπει η μέση τιμή OD του θετικού ελέγχου, μετά την αφαίρεση της τιμής του κενού υποστρώματος, να βρίσκεται εντός της περιοχής εγκυρότητας, η οποία αναφέρεται στο ειδικό για την παρτίδα πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου.
- Η απόκλιση των τιμών OD δεν μπορεί να είναι υψηλότερη από 20%.

2.1.4 Αξιολόγηση δοκιμασιών SERION ELISA classic λεπτόσπειρα IgG/ IgM

Προκειμένου να αξιολογηθεί η πορεία των δοκιμασιών, μας παρέχεται από την εταιρία ένας πίνακας αξιολόγησης τιμών σε κάθε συσκευασία δοκιμασίας.

Αξιολόγηση για SERION ELISA classic λεπτόσπειρα IgG:

Θετικό αποτέλεσμα δοκιμασίας:	> 9	U/ml
Οριακό αποτέλεσμα δοκιμασίας:	5-9	U/ml
Αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας:	< 5	U/ml

Αξιολόγηση για SERION ELISA classic λεπτόσπειρα IgM:

Θετικό αποτέλεσμα δοκιμασίας:	> 20	U/ml
Οριακό αποτέλεσμα δοκιμασίας:	15-20	U/ml
Αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας:	< 5	U/ml

2.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.2.1 Πρωτόκολλο προετοιμασίας δειγμάτων και πειράματος PCR

Εκχύλιση DNA

Αργή μεθόδου

Το DNA βρίσκεται στο εσωτερικό των κυττάρων. Για να μπορέσει να απομονωθεί είναι απαραίτητο να διασπαστούν οι κυτταρικές μεμβράνες και οι μεμβράνες των υποκυτταρικών οργανιδίων όπως ο πυρήνας, απελευθερώνοντας το σε διαλυτή μορφή. Σημαντικό βήμα είναι η απομόνωση του από τα άλλα μακρομόρια, όπως RNA και πρωτεΐνες. Στην παρούσα μελέτη η απομόνωση βασίζεται στο αρνητικό φορτισμένο DNA και στην τεχνολογία των μαγνητικών σφαιρών, οι οποίες είναι θετικά φορτισμένες και προσροφούν το DNA.

Πειραματική Διαδικασία

Για την εκχύλιση του DNA των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε το αυτόματο σύστημα Magtration System 12GC και MegaZorb DNA Common Kit-200N. Συγκεκριμένα το τελευταίο πραγματοποιεί την εξής διαδικασία:

1. Κυτόλυση και απελευθέρωση του DNA και των υπολοίπων μακρομορίων σε διαλυτή μορφή.
2. Προσθήκη μαγνητικών σφαιρών οι οποίες αποτελούνται από θετικά φορτισμένο υλικό και σχηματίζουν ιονικό δεσμό με το αρνητικό φορτίο του DNA.
3. Πλύσεις με ειδικά διαλύματα για να απομακρυνθούν τα υπόλοιπα μακρομόρια.
4. Τέλος σε καθαρό tube εκλύεται το DNA με μείωση του pH μέσω προσθήκης ειδικού αντιδραστηρίου.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Συστατικά και ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR

Τα βασικά συστατικά μιας PCR αντίδρασης είναι το DNA (ή RNA) που θα χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα, η DNA πολυμεράση, τα dNTPs, οι εκκινητές και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Όσον αφορά στο **υπόστρωμα**, η τεχνική απαιτεί ελάχιστη ποσότητα αρχικού υλικού: για DNA γονιδιώματος είναι αρκετή ποσότητα μικρότερη του μικρογραμμαρίου. Θεωρητικά υπάρχει η δυνατότητα της ενζυμικής ενίσχυσης ενός και μόνο μορίου DNA, ωστόσο σε αυτά τα πειράματα θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην αποφυγή επιμολύνσεων. Το αρχικό υλικό DNA δεν είναι απαραίτητο να έχει την υψηλή καθαρότητα και ακεραιότητα που απαιτούνται για άλλες τεχνικές (όπως Southern blot και in situ υβριδισμός). Οι πηγές απομόνωσης του DNA ποικίλλουν και μπορεί να είναι ιστοί ή σωματικά υγρά (αίμα, πτύελα, τραχηλικό κ.ά.). Ως υπόστρωμα της αντίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και RNA, εφόσον προηγηθεί ανάστροφη μεταγραφή του σε cDNA (RT PCR αντίδραση).

Οι **DNA πολυμεράσες** είναι ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση σύνθεσης πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων από μονομερή τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας ως μήτρα την μία από τις δύο αρχικές αλυσίδες DNA. Η εισαγωγή των θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών στην τεχνική της PCR αποτέλεσε μία από τις βασικότερες τεχνολογικές βελτιώσεις της. Πριν την ανακάλυψή τους, επειδή οι πολυμεράσες που χρησιμοποιούνταν ήταν ευαίσθητες στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνταν για την αποδιάταξη του DNA, ήταν αναγκαία η συνεχής προσθήκη φρέσκου ενζύμου σε κάθε PCR κύκλο. Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη πολυμεράση στην PCR είναι η Taq που προέρχεται από τον οργανισμό *Thermus aquaticus*. Η πολυμεράση Tth προερχόμενη από το βακτήριο *Thermus thermophilus* μπορεί να δράσει ως ανάστροφη μεταγραφή του RNA.

Κατά την διάρκεια του πολυμερισμού απαιτούνται υψηλής καθαρότητας **dNTPs** σε συγκεντρώσεις 100-200 μM . Σε μικρότερες συγκεντρώσεις (10-100 μM) η πολυμεράση παρουσιάζει μεγαλύτερη πιστότητα, ωστόσο η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs εξαρτάται και από την συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου (**MgCl₂**). Τα ιόντα μαγνησίου δημιουργούν ένα διαλυτό σύμπλεγμα με τα dNTPs το οποίο είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωσή τους στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA, ενώ

συγχρόνως είναι απαραίτητα για την ενεργότητα της πολυμεράσης. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητά τους διότι μικρότερες συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου ελαττώνουν την απόδοση της PCR αντίδρασης, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαττώνουν την ειδικότητα της αντίδρασης και προκαλούν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Οι συνήθεις ιδανικές συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου είναι περίπου 25 mM/αντίδραση [58].

Ως προς τους **εκκινητές (primers)**, πρόκειται για συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία χρησιμεύουν ως εκκινητές της DNA πολυμεράσης για την αντίδραση επέκτασης και ταυτόχρονα εξασφαλίζουν την ειδικότητα της αντίδρασης. Η γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας γύρω από την περιοχή που επιθυμούμε να ενισχύσουμε αποτελεί την βάση για τον σχεδιασμό του ζεύγους των εκκινητών. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να έχουν πλήρη ομολογία με την αλληλουχία-στόχο. Είναι στατιστικώς αποδεδειγμένο ότι όταν μία αλληλουχία DNA έχει μήκος τουλάχιστον 20bp τότε είναι μοναδική στο γονιδίωμα. Συνεπώς, η επιλογή εικοσαμερών για εκκινητές επιτρέπει την ειδική ενίσχυση αλληλουχιών. Πράγματι, αυτό είναι και το μέσο μήκος των εκκινητών στην συντριπτική πλειοψηφία των εφαρμογών. Τους δίνει τέτοια θερμοδυναμική σταθερότητα ώστε σε θερμοκρασία περίπου 55°C να αποδιατάσσονται. Η συνήθης συγκέντρωση ενός εικοσαμερούς εκκινητή σε μία PCR αντίδραση είναι 0.5 μM.

Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών υπολογίζεται από τα αντίστοιχα T_m των ολιγονουκλεοτιδίων ως εξής: (αριθμός των βάσεων A+T) x 2°C + (αριθμός των βάσεων G+C) x 4°C [66], και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 37°C και 60°C. Ανάμεσα σε αυτές τις τιμές βρίσκεται η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού T_m κατά την οποία το 50% των μορίων είναι αποδιαταγμένο. Υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνουν πιο εξειδικευμένο υβριδισμό, χαμηλότερης όμως απόδοσης. Η επιλογή χαμηλότερης θερμοκρασίας αυξάνει την απόδοση εις βάρος της ειδικότητας, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο δημιουργίας παραπροϊόντων της PCR αντίδρασης, εάν οι εκκινητές προσδεθούν σε άλλες μόνο θέσεις του γονιδιώματος με σχετική μόνο ομολογία ως προς αυτούς.

Για την PCR χρησιμοποιούνται διάφορα **ρυθμιστικά διαλύματα** που ρυθμίζουν την τιμή του pH και ταυτόχρονα προμηθεύουν τους απαραίτητους παράγοντες και σταθεροποιητικές ουσίες για την μέγιστη απόδοση της πολυμεράσης. Στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά ρυθμιστικά διαλύματα. Ένα τυπικό ρυθμιστικό διάλυμα περιλαμβάνει τα εξής: Tris-HCl σε τελική συγκέντρωση 10 mM και pH 8.4, 50 mM

KCl, 10 mM MgCl₂, 0.01% ζελατίνη, 0.01% NP40 και 0.01% Tween 20. Τα μη ιονικά απορρυπαντικά μπορούν να αντικατασταθούν από 0.1% Triton X-100, ενώ είναι δυνατόν να διαφέρει και η συγκέντρωση των αλάτων.

Σχεδιασμός των εκκινήτων και συνθήκες των αντιδράσεων PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση είναι μία *in vitro* ενζυμική σύνθεση τμημάτων DNA με την βοήθεια δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων που βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής του δίκλωνου DNA που πρόκειται να επιμηκυνθεί [60].

5 μl από το εκχυλισμένο DNA κάθε δείγματος υφίσταται ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση περιλαμβάνει 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος, 100 μM από το κάθε dNTP, 1.5mM MgCl₂, 1pM από κάθε εκκινήτη και 0.1U Taq πολυμεράση (Fermentas). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο δείγματα με όλα τα υλικά της PCR εκτός του εκχυλισμένου DNA ως ελεγκτικά στοιχεία (αρνητικοί μάρτυρες) για πιθανή επιμόλυνση στην αντίδραση. Η αντίδραση επωάζεται σε κατάλληλο πρόγραμμα του κυκλοποιητή (PTC-200 Peltier Cycler, MJ RESEARCH), αναλόγως με τους εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν.

A) Συνθήκες των αντιδράσεων PCR

β2-σφαιρίνη: Για τον έλεγχο της επιτυχούς εκχύλισης του DNA, και της καταλληλότητάς του (απουσία αναστολέων) να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα από την Taq πολυμεράση, ελέγχθηκαν όλα τα δείγματα με ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου της β2-σφαιρίνης. Το γονίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο μάρτυρας, μιας και πρόκειται για ένα γονίδιο που περιέχουν όλα τα ανθρώπινα κύτταρα. Το μίγμα προ-επωάστηκε για 4min στους 94°C και ακολούθησαν 35 κύκλοι ενίσχυσης με τις συνθήκες που παρατίθενται ακολούθως. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι: 95°C για 1min, 58°C για 1min και 72°C για 1min. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος 280bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Leptospira PCR: Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινήτες *Lepto-1* και *Lepto-2*. Οι εκκινήτες αντιστοιχούν στα νουκλεοτίδια 38-57 και 348-368 του γονιδίου *pts* (16S) της *L.interrogans*(βιβλ). Οι συνθήκες της ενίσχυσης είναι οι εξής: 94°C για 3 min, 63°C για 1,5 min και 72°C για 2 min, και επαναλαμβάνονται 30 κύκλοι. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος 331 bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

B) Σχεδιασμός των εκκινητών

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR αντιδράσεις που περιγράφηκαν ανωτέρω είναι οι ακόλουθοι:

β2-1 : 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'

β2-2 : 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'

Lepto-1 : 5'-GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG -3'

Lepto-2 : 5'-TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT -3'

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

Το DNA ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου. Η επιλογή του συγκεκριμένου πηκτώματος εξαρτάται από το μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί και από την διακριτική ικανότητα που θέλουμε να επιτύχουμε. Το πήκτωμα αγαρόζης είναι καταλληλότερο για την ηλεκτροφόρηση μεγάλων τμημάτων DNA καθώς και για μεγάλες διαφορές μεγέθους τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν. Η συνήθης συγκέντρωση του πηκτώματος αγαρόζης είναι 1 έως 2%. Αντίθετα, το πήκτωμα ακρυλαμιδίου επιλέγεται για μικρότερα τμήματα DNA και για διάκριση μικρών μεταξύ τους διαφορών μεγέθους. Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου αποτελείται από μείγμα ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου σε αναλογία 19:1. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, για τους ανωτέρω λόγους, η ηλεκτροφόρηση του DNA έγινε σε πηκτώματα αγαρόζης, LE Agarose (ISCBioEspress).

Όσον αφορά στον τρόπο παρασκευής του πηκτώματος αγαρόζης ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα της γέλης ποσότητα αγαρόζης διαλύεται σε διάλυμα 1X TBE και η αγαρόζη τήκεται με βρασμό σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 10 λεπτά. Το TBE (Ambion) είναι ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8.3 το οποίο αποτελείται από 10.8 g/l Tris, 5.5 g/l βορικό οξύ και 0.002M EDTA. Ακολούθως, η αγαρόζη αφήνεται να κρνώσει και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, EtBr (Research Organics) σε τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml. Το διάλυμα αυτό τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει «κτένα» η οποία δημιουργεί τα «πηγάδια» για το φόρτωμα των δειγμάτων. Η πήξη για την αγαρόζη επιτυγχάνεται με την πτώση της θερμοκρασίας της.

Το στερεοποιημένο πήκτωμα μετά την αφαίρεση της «κτένας», εμβαπτίζεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης (EC105-LVD Submarine Gel System Classic, Thermo Electron Co) που περιέχει 1X TBE. Το δείγμα DNA που πρόκειται να

ηλεκτροφορηθεί, επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης (loading buffer, Fermentas) και εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση από το τροφοδοτικό (EC105-LVD, Thermo Electron Co.). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου και 25% φικόλη. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA γίνονται άμεσα ορατές με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία (MiniBisPro, Bio-Imaging Systems).

2.2.2 Πρωτόκολλο προετοιμασίας δειγμάτων και πειράματος Real-Time PCR

Απομόνωση RNA από βιολογικά δείγματα

Η απομόνωση πραγματοποιείται με το Leptospira 16s RNA Real-TM της Sacace. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

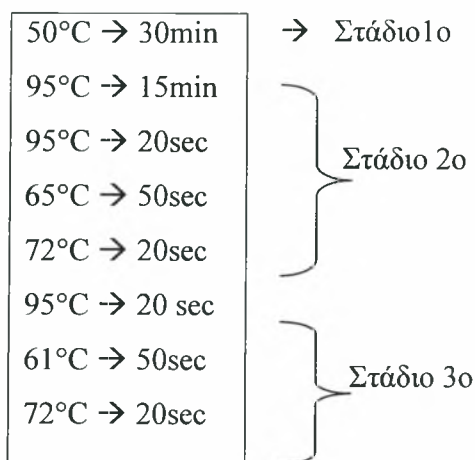
1. Θερμαίνονται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 60-65°C τα υγρά διαλύματα Lysis Solution και Washing Solution, τα οποία αποθηκεύονται στους 2-8 °C, ώστε να αποκρυσταλλοποιηθούν . Προετοιμάζονται σωληνάκια erpendorf για όλα τα δείγματα καθώς επίσης και για το θετικό και αρνητικό μάρτυρα της εκχύλισης.
2. Προστίθενται σε όλα τα erpendorf από 450 μl Lysis Solution και 10 μl IC(internal control).
3. Προστίθενται 100 μl δείγματος σε καθένα απο τα αντίστοιχα σωληνάκια που περιέχουν Lysis Solution και IC. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
4. Προετοιμάζονται μάρτυρες ως εξής:
 - Προστίθενται 100 μl C-Negative Control στα σωληνάκια του θετικού και αρνητικού μάρτυρα.
 - Προστίθενται 10 μl Leptospira 16s Rna C+ rec στο σωληνάκι του θετικού μάρτυρα.
5. Ακολουθεί ανάδευση όλα τα σωληνάκια και φυγοκέντρωση για 5 sec στις 5000g.
6. 25 μl διαλύματος Sorbent προστίθενται σε καθένα απο τα σωληνάκια.
7. Ακολουθεί ανάδευση για 5-7 sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.

8. Όλα τα σωληνάρια φυγοκεντρώνται για 1 min στις 10000g και στη συνέχεια με μια πιπέτα απομακρύνεται το υπερκείμενο χωρίς να παρθεί το ίζημα που έχει δημιουργηθεί από την προσθήκη του Sorbent.
9. Προστίθενται 400 µl από το Washing Solution σε καθένα από τα σωληνάκια. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση για 1 min στις 10000g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο χωρίς να καταστραφεί το ίζημα.
10. Προστίθενται 500 µl αιθανόλης 70% σε καθένα από τα σωληνάκια. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση για 1 min στις 10000g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο χωρίς να καταστραφεί το ίζημα.
11. Επαναλαμβάνεται το στάδιο 10.
12. Προστίθενται 400 µl ακετόνης σε καθένα από τα σωληνάκια. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση για 1 min στις 10000g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο χωρίς να καταστραφεί το ίζημα.
13. Στην συνέχεια ακολουθεί επώαση των σωληναρίων με ανοιχτό καπάκι στους 60°C για 10 min.
14. Έπειτα προστίθενται 40 µl RNA-eluent και εν συνεχεία επώαση των σωληναρίων στους 60°C για 10 min. Το υπερκείμενο υγρό είναι το RNA.

Real-Time PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο)

Οι αντιδράσεις της Real-Time PCR πραγματοποιούνται στο μηχάνημα Rotor –Gene 6000 της Qiagen.

- Αρχικά προετοιμάζεται το master mix προσθέτοντας για κάθε δείγμα 10µl RT-PCR-mix-1-TM, 5 µl RT-PCR-mix-2-TM, 0,5 µl TaqF Polymerase, 0,25 µl M-MLV Revertase και 0,25 µl RT-G-mix-2. Επίσης ετοιμάζονται και οι μάρτυρες της real time ως εξής:
 - ❖ Προστίθενται 10µl RNA-eluent στον αρνητικό μάρτυρα.
 - ❖ Προστίθενται 10µl *Leptospira cDNA C+* στον θετικό μάρτυρα.
- Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε σωληνάρια χωρητικότητας 0,2 ml. Για την αντίδραση χρησιμοποιούνται 15µl master mix και 10µl RNA (Reaction volume 25µl). Τα σωληνάρια παίρνουν θέση σε ειδική κεφαλή 36 υποδοχών του θερμοκυκλοποιητή.
- Στη συνέχεια ενεργοποιείται η έναρξη των αντιδράσεων. Συνολικά πραγματοποιούνται 48 κύκλοι ενίσχυσης. Το πρόγραμμα που ακολουθείται αναλυτικά περιγράφεται παρακάτω:



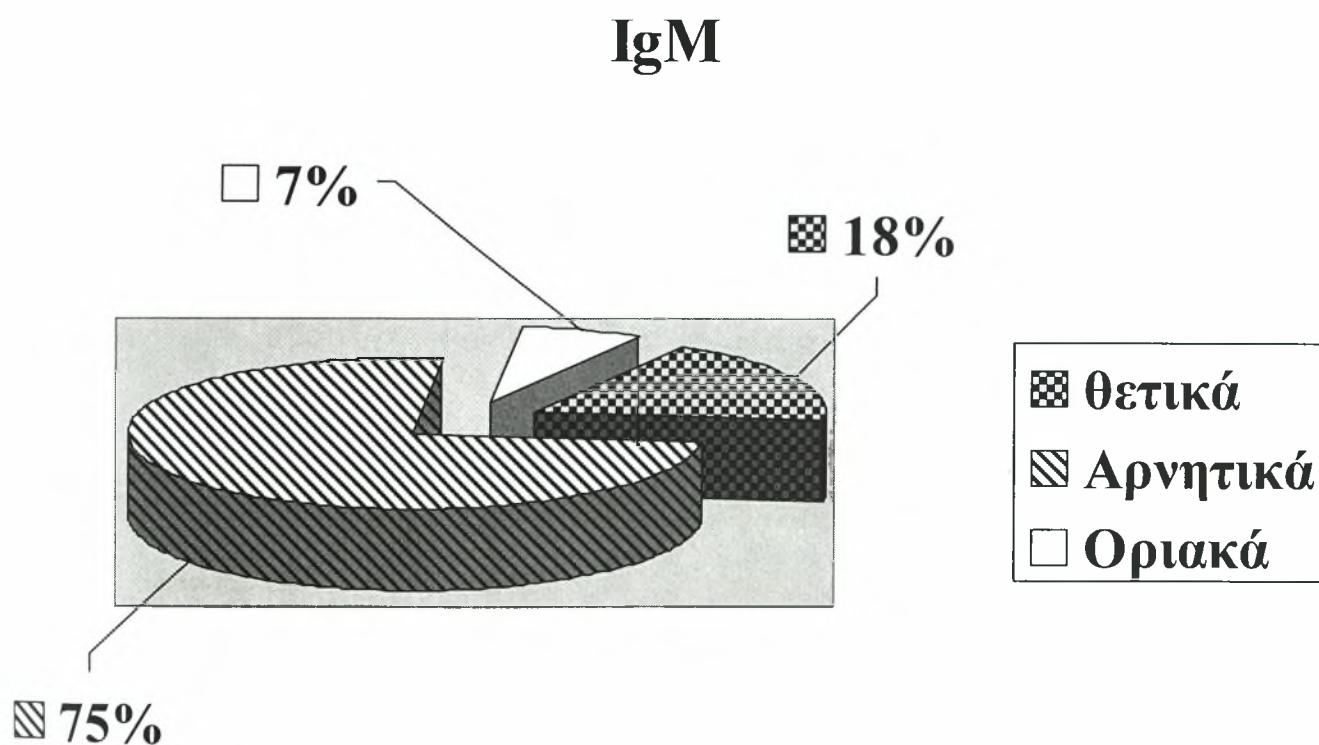
Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται μέσω του λογισμικού της Rotor-Gene 6000 στον κεντρικό υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος. Στο πράσινο κανάλι ανιχνεύουμε το IC ως μάρτυρα της σωστής εκχύλισης του RNA των δειγμάτων μας και στο κίτρινο κανάλι ανιχνεύεται η παρουσία ή όχι του βακτηρίου της λεπτόσπειρας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

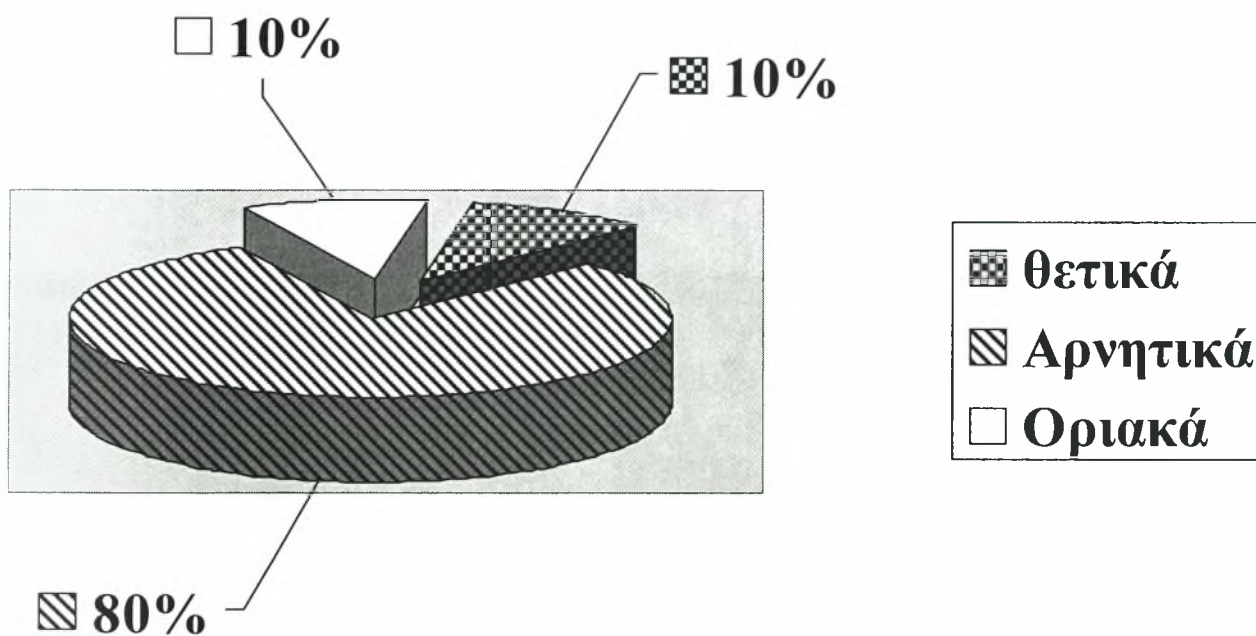
Για την ανίχνευση των ειδικών IgM και IgG αντισωμάτων εφαρμόστηκε ELISA, στην οποία ως αντιγόνο χρησιμοποιείται μη παθογόνο στέλεχος *L.biflexa* (Serion Immundiagnostica GmbH, Germany). Η εφαρμογή της μεθόδου έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας. Τα αποτελέσματα της ELISA καταγράφονται στα γραφήματα 1&2 καθώς επίσης και στον πίνακα 2. Μετά την καταγραφή των αντισωμάτων εφαρμόστηκε συμβατική PCR και Real-Time PCR. Τα αποτελέσματα και των δύο μοριακών τεχνικών ήταν αρνητικά τόσο στα δείγματα που ανιχνεύτηκαν αντισώματα, όσο και σ'αυτά που ανιχνεύτηκαν. Οι θετικοί μάρτυρες και των δύο τεχνικών δούλεψαν.

Γράφημα 1. Κατανομή των ειδικών αντισωμάτων IgM



Γράφημα 2. Κατανομή των ειδικών αντισωμάτων IgG

IgG



Πίνακας 2. Τίτλοι αντισωμάτων IgM&IgG

	Θετικά	Αρνητικά	Οριακά
IgM (πρόσφατης λοίμωξης)	11 (18%)	45 (75%)	4 (7%)
IgG (παλαιότερης λοίμωξης)	6 (10%)	48 (80%)	6 (10%)

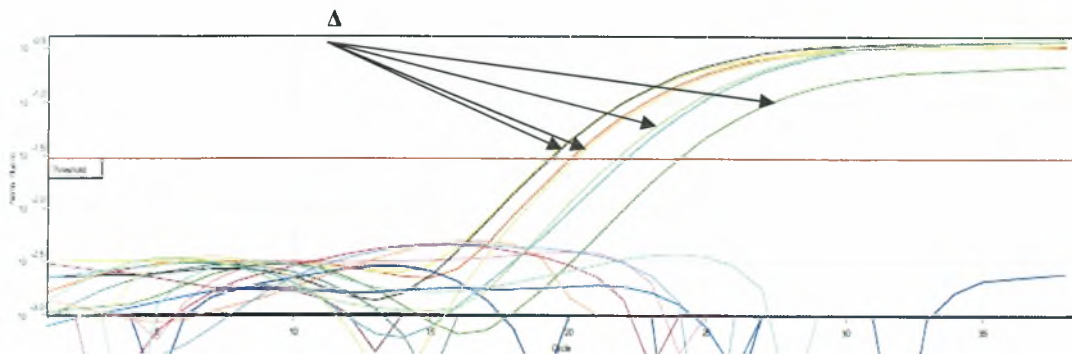
Πίνακας 3. Αποτελέσματα ορολογικών εξετάσεων και PCR των 60 δειγμάτων με κλινική σημειολογία λεπτοσπείρωσης

Δείγματα	IgM αντισώματα	IgG αντισώματα	PCR	Real-Time PCR
2	+	+	-	-
11	+	-	-	-
4	-	+	-	-
43	-	-	-	-

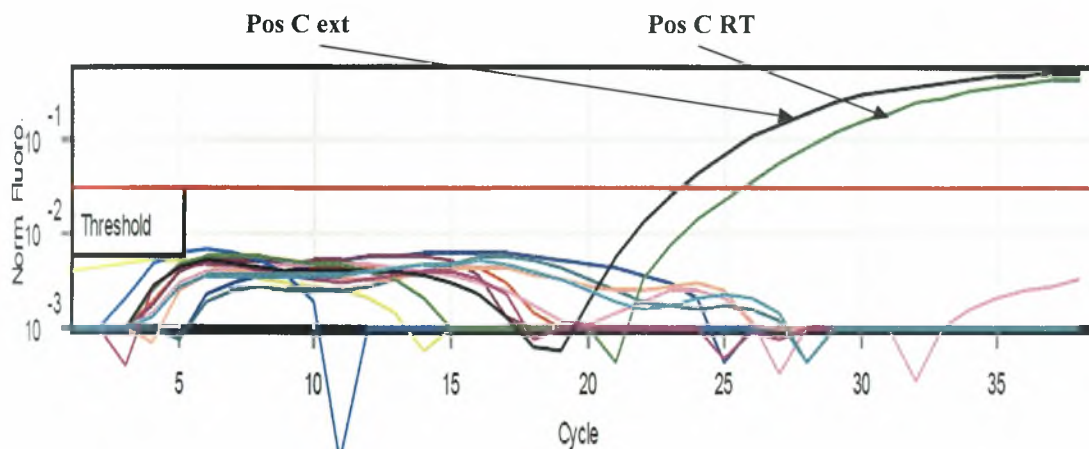


Εικόνα 9. Ενδεικτικό gel αгарόζης στο οποίο φορτώθηκαν τα προϊόντα της PCR. Αποτελέσματα της PCR με στόχο το *rrs* (16S) γονίδιο. Διακρίνεται ο θετικός μάρτυρας(προϊόν 331 bp) στη θέση 15, M: Ladder 100 bp

Εφαρμόστηκε PCR σε πραγματικό χρόνο και όλα τα αποτελέσματα μας βρέθηκαν αρνητικά. Παρακάτω παραθέτουμε ενδεικτικά γράφηματα ανάλυσης των δειγμάτων με Real-Time PCR.



Γράφημα 3. Ανίχνευση του IC σε δείγματα στο πράσινο κανάλι (FAM)



Γράφημα 4. Ανίχνευση *Leptospira* 16s RNA στο κίτρινο κανάλι (JOE)

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λεπτοσπείρωση οφείλεται στη σπειροχαίτη του γένους *Leptospira*. Η αρχική ταξινόμηση μέσα στο γένος *Leptospira* στηρίχθηκε σε τεχνικές συγκολλητινοαντίδρασης και διαχωρίστηκε στην παθογόνο *L.interrogans* και στη μη παθογόνο *L.biflexa*[42]. Αργότερα όμως μελέτες με μοριακές τεχνικές έδειξαν γενετικές διαφορές μεταξύ αυτών των ειδών και οδήγησαν σε τροποποίηση του κλασικού σχήματος ταξινόμησης. Σύμφωνα με το νέο σχήμα ταξινόμησης διακρίνονται 16 γενοείδη της *Leptospira* με μεγάλο αριθμό οροομάδων και οροτύπων[7]. Η *L.interrogans* θεωρείται το πιο συχνό είδος λεπτόσπειρας που προκαλεί νόσο στον άνθρωπο, έχουν περιγραφεί όμως και περιπτώσεις νόσου που προκλήθηκαν από άλλα είδη[43].

Η λεπτοσπείρωση παρουσιάζει μεγάλη συχνότητα σε ορισμένες περιοχές του κόσμου, όπου προκαλεί σποραδικές περιπτώσεις, αλλά και υδατογενείς επιδημίες. Τέτοια επιδημία εκδηλώθηκε το 2000 στη Μαλαισία κατά τη διάρκεια αθλητικών αγώνων[44]. Τις τελευταίες δεκαετίες όμως η συχνότητα της νόσου έχει ελαττωθεί σημαντικά σε ορισμένες χώρες, όπως η Ιταλία, η Δανία και η Νέα Ζηλανδία[45-47]. Η λεπτοσπείρωση παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα σε αγροτικές περιοχές όπου υπάρχουν προδιαθεσικοί παράγοντες εμφάνισης της νόσου, όπως είναι ορισμένα επαγγέλματα (κτηνοτρόφοι, γεωργοί, εργαζόμενοι στα δάση)[48]. Σε χώρες με εύκρατο κλίμα η μεγαλύτερη συχνότητα της νόσου παρατηρείται κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, γιατί είναι πιο συχνή η έκθεση των ατόμων σε μολυσμένα νερά και η επιβίωση της λεπτόσπειρας στο περιβάλλον είναι μεγαλύτερη.

Τα συμπτώματα της νόσου στους περισσότερους ασθενείς είναι ήπια και μικρής διάρκειας και συχνά τέτοιες περιπτώσεις μένουν αδιάγνωστες. Επίσης διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι συχνά οι ασθενείς παραμένουν ασυμπτωματικοί[49].

Η διάγνωση της νόσου τυπικά στηρίζεται στα κλινικά, επιδημιολογικά και ορολογικά χαρακτηριστικά. Συνήθως η διάγνωση που στηρίζεται στην κλινική εικόνα δεν είναι ακριβής, ιδιαίτερα σε περιοχές όπου παρατηρούνται συχνά παρόμοια οξέα εμπύρετα νοσήματα, όπως τυφοειδής πυρετός, γρίπη, ρικετσιώσεις και άλλα. Η εργαστηριακή διάγνωση της νόσου στηρίζεται, είτε στην απομόνωση του μικροοργανισμού από κλινικά δείγματα, είτε στην ανεύρεση ειδικών αντισωμάτων στον ορό. Η λεπτόσπειρα μπορεί να απομονωθεί από την καλλιέργεια δειγμάτων αίματος ή ENY, τα οποία λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας της νόσου και αργότερα από

δείγματα ούρων. Σημαντική ποικιλία ορολογικών εξετάσεων έχουν αναπτυχθεί για την εργαστηριακή διάγνωση της νόσου. Η μικροσκοπική συγκολλητινοαντίδραση αποτελεί την κλασική μέθοδο ορολογικής επιβεβαίωσης της νόσου και χρησιμοποιείται ως «gold standard» μέθοδος, αλλά είναι πολύπλοκη, χρονοβόρος και απαιτούνται ζωντανά στελέχη λεπτόσπειρας και μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου. Διάφορες άλλες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την ορολογική διάγνωση της νόσου, όπως ELISA, ανοσοφθορισμός και έμμεση αιμοσυγκόλληση[50-52]. Τα τελευταία χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση της νόσου διάφορες μοριακές μέθοδοι και ιδιαίτερα η PCR, με τις οποίες ανιχνεύεται το DNA της λεπτόσπειρας σε κλινικά δείγματα, ιδιαίτερα τις πρώτες ημέρες εμφάνισης της νόσου[53,54,55]. Η λεπτοσπείρωση στην Ελλάδα ανήκει στα υποχρεωτικώς δηλούμενα νοσήματα και κατά τη διάρκεια των 9 τελευταίων ετών δηλώθηκαν στο Κέντρο Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων 265 περιπτώσεις νόσου. Η πραγματική επίπτωση της νόσου στην Ελλάδα πιθανώς να είναι πολύ υψηλότερη, γιατί πολλές ήπιες ή υποκλινικές περιπτώσεις παραμένουν αδιάγνωστες. Στην Ελλάδα έχουν γίνει μελέτες που αναφέρονται στην επίπτωση της νόσου σε επιλεγμένους όμως πληθυσμούς[56,57].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δεν επιβεβαιώθηκε καμία περίπτωση λεπτοσπείρωσης από το συνολικό αριθμό δειγμάτων που εξετάστηκαν, παρά την παρουσία ειδικών αντισωμάτων IgG/IgM σε 17 από τα 60 δείγματα. Όλες οι περιπτώσεις των ασθενών παρουσίαζαν συμπτώματα ενδεικτικά λεπτοσπείρωσης.

Βρέθηκαν 11(18%) δείγματα ασθενών που παρουσίαζαν IgM αντισώματα που σημαίνει πρόσφατη λοίμωξη και 6(10%) δείγματα που εμφάνισαν IgG, ένδειξη παλαιότερης λοίμωξης. Στα υπόλοιπα δείγματα δεν διαπιστώθηκε αντισωματική απάντηση. Μελέτες έχουν δείξει ότι σε ορισμένους ασθενείς παρατηρείται σημαντική ανοσολογική απάντηση, ενώ σε άλλους δεν ανιχνεύονται αντισώματα[43,61,62]. Η έναρξη της θεραπείας με αντιβιοτικά νωρίς σε σχέση με την εμφάνιση της νόσου μπορεί να επηρεάσει την ανοσολογική απάντηση και έτσι δεν ανιχνεύονται ειδικά αντισώματα.

Η συμβολή των κλασικών μεθόδων στη διάγνωση των λοιμώξεων είναι μακρά και σημαντική. Ωστόσο ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εφαρμογή μοριακής μεθόδου για τη διάγνωση της λεπτοσπείρωσης και η σύγκριση με τις κλασικές. Έτσι εκτός των κλασικών μικροβιολογικών προσεγγίσεων εφαρμόσαμε δύο μοριακές τεχνικές και συγκεκριμένα η απλή PCR που είχε στόχο το γονίδιο *fts* (16S) της

L.interrogans και η Real Time PCR με στόχο το ίδιο γονίδιο. Τα αποτελέσματα και των δύο τεχνικών ήταν αρνητικά για όλα μας τα δείγματα. Οι θετικοί μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν στις μεθόδους δούλεψαν κανονικά. Οι λόγοι που δεν είχαμε θετικά αποτελέσματα στην PCR ενώ είχαμε στις ορολογικές εξετάσεις υποθέτουμε είναι οι εξής:

A) Να υπήρχε παρουσία του βακτηρίου της λεπτόσπειρας αλλά η PCR να δίνει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

B) Τα αντισώματα που παρουσιάζονται να είναι ψευδώς θετικά.

Ως αναφορά την πρώτη υπόθεση, είναι πολύ πιθανό η λεπτόσπειρα να υπάρχει αλλά η PCR να μας δίνει αρνητικά αποτελέσματα. Και αυτό διότι ο ασθενής μπορεί να προσήλθε καθυστερημένα για την εξέταση. Βιβλιογραφικές αναφορές κάνουν λόγο για θετικοποίηση των ορολογικών αποτελεσμάτων μετά την πάροδο δύο εβδομάδων και αρνητικοποίηση της PCR [63,50,29,65]. Πιο συγκεκριμένα σημαντικό είναι να αναφέρουμε για τις φάσεις που διαδράμει η νόσος και η δυσκολία απομόνωσης του βακτηρίου κατά τη διάρκεια της κάθε φάση με την PCR. Οι λεπτόσπειρες παρουσιάζουν δύο φάσεις, οι οποίες αλληλεπικαλύπτονται. Μετά την περίοδο της επώασης η οποία κυμαίνεται από 2 έως 20 μέρες, αρχίζει η πρώτη φάση. Η διάρκεια της είναι ~1 εβδομάδα και χαρακτηρίζεται από βακτηραιμία και από έντονα συμπτώματα και σημεία συστημικής λοίμωξης, μυϊκός πόνος, γενική κακουχία, δηλαδή το στάδιο κατά το οποίο ο ασθενής εισέρχεται για εξέταση (συμπτωματολογία). Όλα αυτά θεωρείται ότι οφείλονται στην απελευθέρωση ενδοτοξινών από τις λεπτόσπειρες που πεθαίνουν[17]. Το συμπέρασμα λοιπόν που βγαίνει είναι ότι λόγω της καθυστερημένης προσέλευσης του ασθενούς για εξέταση και σε συνδιασμό παρουσίας ενδοτοξινών από τον θάνατο της λεπτόσπειρας η τεχνική της PCR δεν ανευρίσκει βακτηριακό φορτίο.

Στη δεύτερη υπόθεση, σε πληθώρα μελετών προκύπτει ότι τα αποτελέσματα των ορολογικών εξετάσεων μπορεί να είναι ψευδώς θετικά [29,30,50]. Τα αντισώματα (συγκολλητίνες, οψονίνες κτλ) εμφανίζονται προς το τέλος της πρώτης εβδομάδας της νόσου και φτάνουν στο ανώτατο τίτλο την τρίτη έως τέταρτη εβδομάδα. Αντίστοιχα, οι τίτλοι των αντισωμάτων πέφτουν, ενώ ανιχνεύονται άλλα αντισώματα (πιθανόν από ύπαρξη άλλης λοίμωξης) και μάλιστα για αρκετό διάστημα.

Συμπερασματικά

- Καθυστερημένη προσέλευση του ασθενούς για ανίχνευση του βακτηρίου της λεπτόσπειρας μπορεί να αποδειχθεί αποτυχία στην έγκαιρη διάγνωση, λόγω διαφοράς φάσης της νόσου.
- Στις περιπτώσεις βακτηριαιμίας φαίνεται οι μοριακές τεχνικές να υπολείπονται σε ευαισθησία σε σχέση με τις κλασσικές μικροβιολογικές προσεγγίσεις. Επίσης το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση ανίχνευσης της λεπτόσπειρας σε βιολογικά δείγματα.
- Είναι γεγονός ότι οι μοριακές τεχνικές είναι σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο στην αρένα των λοιμώξεων. Ωστόσο και αυτές έχουν κάποιους περιορισμούς. Η ανίχνευση βακτηριακού DNA στο κλινικό δείγμα δεν σημαίνει οπωσδήποτε βιώσιμο μικροοργανισμό. Η αξιολόγηση του αποτελέσματος των μοριακών τεχνικών απαιτεί εμπειρία, γνώση των περιορισμών και επικοινωνία με τον κλινικό ιατρό.
- Παρά τα τρία κύρια πλεονεκτήματα των μοριακών τεχνικών, που είναι η *ταχύτητα*, η *ειδικότητα* και η *ευαισθησία*, οι τεχνικές αυτές αδυνατούν να αντικαταστήσουν τις κλασσικές μεθόδους. Πιστεύουμε όμως ότι ο συνδυασμός τους θα συμβάλει ουσιαστικά στη διάγνωση και στη θεραπεία της λεπτοσπείρωσης.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λεπτοσπείρωση αποτελεί μία ζωνόσο που προκαλείται από στελέχη του γένους *Leptospira*. Δεν είναι συχνή νόσος για τον άνθρωπο με εξαίρεση τις τροπικές περιοχές. Είναι επαγγελματικό νόσημα των ατόμων που ασχολούνται με τα ζώα. Η λεπτοσπείρωση διαβιβάζεται από τα ούρα ενός μολυσμένου ζώου, και είναι μεταδοτικό εφ' όσον είναι ακόμα υγρό. Οι άνθρωποι μολύνονται μέσω της επαφής με το νερό, τα τρόφιμα, ή το χώμα που περιέχει τα ούρα από αυτά τα μολυσμένα ζώα. Αυτό μπορεί να συμβεί με την κατάποση των μολυσμένων τροφίμων ή του νερού ή μέσω της επαφής δερμάτων. Στους ανθρώπους, η μόλυνση από *Leptospira* προκαλεί ένα ευρύ φάσμα των συμπτωμάτων, και μερικές φορές μολυσμένα άτομα μπορεί να μην εμφανίσουν κανένα σύμπτωμα. Η λεπτοσπείρωση είναι μια διφασική ασθένεια που αρχίζει με συμπτώματα όπως (πυρετός, ψύχρες, έντονος πονοκέφαλος). Η πρώτη φάση επιλύει, και ο ασθενής είναι εν συντομία ασυμπτωματικός έως ότου αρχίζει η δεύτερη φάση. Αυτό χαρακτηρίζεται από τη μηνιγγίτιδα, τη ζημία συκωτιού (που προκαλούν τον ίκτερο), και τη νεφρική ανεπάρκεια κ.λπ.

Η *Leptospira* ανήκει στο γένος των βακτηριδίων *spirochaete*, συμπεριλαμβανομένου ενός μικρού αριθμού παθογόνων και σαπροφυτικών ειδών. Τα μέλη *Leptospira* ομαδοποιούνται επίσης σε ορότυπους σύμφωνα με την αντιγονική συγγένειά τους. Υπάρχουν αυτήν την περίοδο πάνω από 200 ορότυποι που αναγνωρίζονται. Μερικοί ορότυποι βρίσκονται σε περισσότερα από ένα είδη *Leptospira*. Αν και πάνω από 200 ορότυποι *Leptospira* έχουν περιγραφεί, όλα τα μέλη του γένους έχουν την παρόμοια μορφολογία. Η *Leptospira* είναι σπειροειδής διαμορφωμένα βακτήρια που είναι 6-20 μm μακρύ και 0.1 μm στην περίμετρο. Επειδή είναι τόσο λεπτά, ζωντανή *Leptospira* παρατηρείται καλύτερα από τη μικροσκόπηση σε σκοτεινό πεδίο. Η *Leptospira* είναι Gram -αρνητικό βακτήριο που αποτελείται από μια κυτταροπλασματική και εξωτερική μεμβράνη. Εντούτοις, το στρώμα πεπτιδογλυκάνης συνδέεται με το κυτταρόπλασμα παρά την εξωτερική μεμβράνη, μια ρύθμιση που είναι μοναδική. Το αξονικό νημάτιο της *Leptospira* επεκτείνεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στις άκρες των βακτηριδίων στο περιπλασμικό διάστημα και είναι απαραίτητα για την κινητικότητα της *Leptospira*.

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε είχε ως σκοπό την ανίχνευση της λεπτόσπειρας με μοριακές τεχνικές και τη σύγκριση αυτών με κλασσικές μικροβιολογικές προσεγγίσεις. Κατά τη διάρκεια της μελέτης εξετάστηκαν συνολικά 60 δείγματα

(ENY/ αίμα/ ούρα) ύποπτα για λεπτοσπείρωση. Στις ορολογικές εξετάσεις 17 από τα 60 δείγματα παρουσίασαν ειδικά αντισώματα IgG και IgM. Σε αντίθεση με τις ορολογικές δοκιμές, οι μοριακές τεχνικές που εφαρμόστηκαν δεν επιβεβαίωσαν κανένα από τα 17 δείγματα που ήταν οροθετικά. Η χρησιμότητα της PCR αξιολογείται όταν εφαρμόζεται στα αρχικά στάδια της νόσου ακόμα και όταν δεν έχουμε χαρακτηριστικά συμπτώματα. Η PCR είναι ευαίσθητη, ειδική και γρήγορη μέθοδος για την διάγνωση της λεπτοσπείρωσης όταν συγκρίνεται με τις ορολογικές μεθόδους και συνδράμει στην έγκυρη διάγνωση της νόσου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Levett MA. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases* 2003; 3:757-771.
2. Lomar AV, Diament D, Torres JR. Leptospirosis in Latin America. *Infect Dis Clin North Am* 14: 23-38, 2000.
3. Wesley Farr R. Leptospirosis. *CID*, 21: 1-8, 1995.
4. Sanford JP. Leptospirosis - time for a booster. *N Engl J Med*, 310: 524-5, 1984.
5. Levett PN. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:296-326
6. Everard, J. D.1996. Leptospirosis., p.111-119. In F. E. G. Cox (ed.), *The Wellcome trust illustrated history of tropical diseases*. The Wellcome Trust, London, U.K.,416-418
7. Brenner DJ. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999; 49:839-58)
8. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill, Wiebe W "Prokaryotes: the unseen majority". *Proc Natl Acad Sci U S A*(1998). 95 :6578–83.
9. Αντωνιάδης Α. Αντωνιάδης Γρ. Λεγάκης Ν. Τσελέντης Ι. Τόμος 2ος . *Ιατρική Μικροβιολογία Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης* 1998;195:243
10. Boursaux-Eude, C., I. Saint Girons, and R.L. Zuerner.1995.IS1500,an IS3-like element from *Leptospira interrogans*. *Microbiology* 141:2165-2173[[crossRef](#)] [[Medline](#)].

11. Paul N Levett. Clinical Microbiology Reviews, April 2001, LABORATORY DIAGNOSIS, p.296-326, Vol. 14, No.2
12. Bharti AR και συν. Peru-United States Leptospirosis Consortium. Lancet Infect Dis. 2003; 3:757-71
13. Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE. Sporadic urban leptospirosis. Ann Intern Med 1996; 125:794-798
14. Σιών Μιχαήλ Λ.. Τροπικά νοσήματα- Νοσοκομειακές λοιμώξεις- Αντιβιοτικά. Εκδόσεις University Studio PRESS. 1996; 695:698
15. Fauci, Braunwald, Isselbacher, Wilson, Martin, Kasper, Hauser, Longo. Εσωτερική παθολογία Harrison. Τόμος 1& 2. Έκδοση Γρ. Παρισίανας. 1998;1288:1291
16. Burriel AR, Kritas SK, Kontos V. Some microbiological aspects of rats captured alive at the port city of Piraeus, Greece. Int J Environ Health Res. 2008;18:159-64.
17. Xue F, Yan J, Picardeau M. Evolution and pathogenesis of Leptospira spp.: lessons learned from the genomes. Microbes Infect. 2008 .
18. Plank , R. and Dean , D. Overview of epidemiology , microbiology , and Pathogenesis of Leptospira spp . in humans Microbes Infect 2: 1265-1276 , 2000 .
19. Ko, A.I. , Galvao Reis , M. , Ribeiro Dourado , G.M. Johnson , W.D. J., Riley , L.W. and the Salvador Leprosy study Group Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil . Lancet 354:820-824, 1999 .
20. Feigin RD, Anderson DC, Human leptospirosis. Crit Rev Lab Sci 5:143-144, 1975

21. Lin PC, Chi CY, Ho MW, Chen CM, Ho CM, Wang JH. Demographic and clinical features of leptospirosis: three-year experience in central Taiwan.J Microbiol Immunol Infect. 2008 ;41:145-50.
22. Gaudie CM, Featherstone CA, Phillips WS, McNaught R, Rhodes PM, Errington J, Fearnley C, Fenner JS, Pritchard GC. Human Leptospira interrogans serogroup icterohaemorrhagiae infection (Weil's disease) acquired from pet rats.Vet Rec. 2008 ;163:599-601
23. Gorbach LS, Bartlet GL, Blacklow RN: Infectious Diseases. WB Saunders Company, U.S.A. 1992
24. Vaughan C, Cronin CC, Walsh EK, Whelton M. The Jarish – Herxheimer reaction in leptospirosis . Postgard Med J,70:118-21,1994
25. Alexander A. Leptospira . In Manual of Clinical Microbiology . American Society for Microbiology 1991, p. 554-559.
26. Agudelo-Flórez P, Restrepo M, Moreno N. Diagnosis of leptospirosis by dark-field microscopy of blood samples and culture] Biomedica. 2008;28:7-9.
27. Rule PL, Alexander AD. "Gellan gum as a substitute for agar in leptospiral media". J Clin Microbiol. 1986 3: 500–504.
28. Αρσένη Αντιγόνη. Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων. Τόμος 2. ιατρικές εκδόσεις Ζήτα. 1994; 717:720
29. Terpstra W, Ligthart G, Schoone G. Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme – linked – immunosorbent assay (ELISA). Zentralb Bakteriol Microbiol Hyg 1980, A 247: 400-405
30. Silva, M. V. , Camargo , E.D. , Batista , Vaz , A.J. , Brandao , A.P. , Nakamura , P.M. , and Negrao , J.M. Behaviour of specific IgM , IgG and IgA class antibodies in

human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence .
J Trop Med Hyg 98: 268-272, 1995 .

31. Smits HL, Chee HD, Eapen CK. Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format Trop Med Int Health 2001;6:114-118

32. Jin DD, Dong HY, Yan J, Li LW, Mao YF. [J774A.1 cell apoptosis induced by Leptospira interrogans and effects of caspase-3, -6 activation on apoptosis. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2008;37:558-63.

33. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am 1990, 262:56-65.

34. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med 1990, 332:178-183.

35. Persing D. Polymerase chain reaction: trenches to benches. J Clin Microbiol 1991, 29:1281-1285.

36. Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. J Mol Endocrinol 34, 597-601.

37. Smythe, L. D., Smith, I. L., Smith, G. A., Dohnt, M. F., Symonds, M. L., Barnett, L. J. & McKay, D. B. (2002). A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. BMC Infect Dis 2, 13.

38. Σφηκιάκης Παύλος, Ελένη Γιαμαρέλλου. Λοιμώξεις και αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας. 1991;720:725

39. Abgueguen P, Delbos V, Blanvillain J, Chennebault JM, Cottin J, Fanello S, Pichard E. Clinical aspects and prognostic factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France. J Infect. Epub 2008;57(3):171-8

40. Χαλεβελάκης ΓΕ, Λεγάκης ΝΙ, Περόγαμβρος ΤΗ: Αντιβιοτικά και συνήθειες λοιμώξεως. 2η έκδοση Χαλεβελάκη, 1994
41. Pharmaceutical Microbiology. Edited by WB Hugo και AD Russell. Έκδοση Blackwell Scientific Publications, 2000;955:959
42. Johnson RC, Faine S. *Leptospira*, In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's manual of systemic bacteriology*. Baltimore Md: Williams & Wilkins. 1984: 62-7
43. Arzouni JP, Parola P, La Scola B, Postic D, Brouqui P, Raoult D. Human infection caused by *Leptospira fainei*. *Emerg Infect Dis* 2002, 8:865-8
44. Centers for Disease Control and Prevention. Update: Outbreak of acute febrile illness among athletes participating in Eco-Challenge-Sabah 2000 – Borneo, Malaysia, 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2001, 50:21-4
45. Ciceroni L, Stepan E, Pinto A, et al. Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. *Europ J Epidemiol* 2000, 16:79-86
46. Thornley CN, Baker MG, Weinstein P, Maas EW. Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. *Epidemiol Infect* 2002, 128:29-36
47. Holk K, Nielsen SV, Ronne T. Human leptospirosis in Denmark 1970-1996: An epidemiological and clinical study. *Scand J Infect Dis* 2000, 32:533-8
48. Johnson MAS, Smith H, Joseph P, et al. Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerg Infect Dis* 2004, 10:1016-22
49. Ashford DA, Kaiser RM, Spiegel RA, et al. Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000, 63:249-54
50. Levett PN, Branch SL, Whittington CU, Edwards CN, Paxton H. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001, 8:349-51

51. Flannery B, Costa D, Pinheiro-Carvalho F, et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2001, 39:3303-10
52. Levett PN, Whittington CU. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998, 36:11-4
53. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992, 30:2219-24
54. Gravekamp C, Van De Kemp H, Franzen M, et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 1993, 139:1691-1700
55. Zuerner RL, Alt D, Bolin CA. IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans sensulato serovars*. *J Clin Microbiol* 1995, 33:3284-9
56. Antoniadis A, Alexiou-Daniel S, Fidani L, Bautz EFK. Comparison of the clinical and serologic diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and leptospirosis. *Europ J Epidemiol* 1995, 11:91-2
57. Melas J, Zafiratos E, Kitsou-Kyriakopoulou S. leptospirosis with severe pulmonary manifestation. *Appl Clin Microbiol Labor Diagn* 1999, 4:83-90
58. Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1991, 30:7661-66.
59. Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH and Itakura K. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human β 2-microglobulin. *PNAS USA* 1981;78: 6613-6615.

60. Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH Jr, et al. Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 1988, 319: 537-541.
61. World Health Organization (2003) Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control.
62. Hartskeerl RA (2006) Leptospirosis: current status and future trends. *Indian J Med Microbiol* 24: 309.
63. Post JC, Ehrlich GD (2000) The impact of the polymerase chain reaction in clinical medicine. *JAMA* 283: 1544–1546.
64. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, et al. Evaluation of polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol* 1995, 43:110-4
65. Woo TH, Patel BK, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF. Comparison of two PCR methods for rapid identification of *Leptospira genospecies interrogans*. *FEMS Microbiol Lett* 1997, 155:169-77

